

MÍRIAN RIBEIRO GALVÃO MACHADO

Nutricionista

Mestre em Ciências

**BEBIDA DE SOJA FERMENTADA COM *Lactobacillus acidophilus*:
VIABILIDADE CELULAR, AVALIAÇÃO SENSORIAL, ARMAZENAMENTO E
RESPOSTA FUNCIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientador: Prof. Dr. César Valmor Rombaldi

Co-Orientador :Prof^ª. Dr^ª. Rosane da Silva Rodrigues

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M149b Machado, Mirian Ribeiro Galvão

Bebida de soja fermentada com *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional / Mirian Ribeiro Galvão Machado. - Pelotas, 2007.

101f. : il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2007, César Valmor Rombaldi, Orientador; co-orientador Rosane da Silva Rodrigues.

1. Extrato de soja 2. Probiótico 3. *Lactobacillus acidophilus* 4. colesterol 5. hamsters I Rombaldi, César Valmor (orientador) II .Título.

CDD 663.33

Banca Examinadora

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi – FAEM/UFPeI - Orientador

Prof^a. Dr^a. Rosane da Silva Rodrigues – DCA/UFPeI - Co-orientadora

Prof^a. Dr^a. Erna Vogt Jong – ICTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Leonor Almeida de Souza Soares – UFPeI

Prof^a. Dr^a. Márcia Arocha Gularte – DCA/UFPeI

Ao Antônio Lilles
pelo amor incondicional;
a Andressa e ao Lucca Lilles,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. César Valmor Rombaldi pela acolhida, orientação, compreensão, suporte técnico e financeiro.

A Prof^a. Dr^a. Rosane da Silva Rodrigues pela orientação, apoio, estímulo, sugestões, paciência e carinhosa amizade.

Ao Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva pelo apoio, orientações e cessão de laboratório.

Ao Antonio Lilles pelo amor, amizade, apoio e tudo o que representa em minha vida.

Aos meus filhos Andressa e Lucca Lilles, razão da minha vida, pela paciência, compreensão, ajuda e tempo roubado.

Aos meus pais, Edi e Maria, pelo exemplo, e aos meus familiares, em especial a Marta, querida irmã, pelo auxílio, incentivo e carinho constantes.

A Taís Letícia Bernardi, pelo incentivo, apoio e carinho.

A Prof^a. Dr^a. Leonor Almeida de Souza Soares pelas valiosas sugestões, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. e Médico Veterinário Milton Amado, chefe do Biotério Central, pelo apoio, amizade e orientações constantes, e a toda a sua equipe, em especial, aos funcionários Vera, Leila, Gerson, Cleimar, Moisés e Luiz Paulo.

Aos acadêmicos de Química de Alimentos: Marina Severo Pólvora, Denise da Fontoura Prates, Adriana Machado, Leandra Zafalon Jaeckel, Márcio Schmiele, e em especial a Patrícia Fernanda Schons, pelo apoio técnico e amizade.

As colegas da pós-graduação Angelita Machado Leitão, Josiane Chim e em especial a Eliane Gouvêa Barbosa, pela amizade e companheirismo.

A colega e Química de Alimentos Andréa Miranda Teixeira, pelo apoio no ensaio biológico.

Aos acadêmicos de Medicina Veterinária Rafael Aldrighi Tavares, Tanaia Mobilia, Wagner Lucheze e Matheus Teixeira, pelo apoio técnico.

A Prof^a. Dr^a. Cristina Gevehr Fernandes e a sua equipe, pelas análises histopatológicas e colaboração.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Silveira da Luz pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Baccarin pela cessão de equipamento de liofilização.

A Dr^a. Maria Inês Genovese pela determinação de isoflavonas.

Ao Farmacêutico-bioquímico Franer Ávila Fucolo pelas determinações bioquímicas de colesterol e triglicerídeos.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos pela amizade, e apoio.

A EMBRAPA SOJA e Danisco Brasil, pelo fornecimento de material de pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro (PROAPP processo 04/266.9).

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao Fim De Tudo

Minhas lágrimas não caem mais
Eu já me transformei em pó
E os meus gritos não se escutam mais
Estão na direção do sol
Meu futuro não me assusta ou faz
Correr pra desprender o nó
Que me amarra a garganta e traz o vazio de viver e só
Se alguém encontrou, um sentido pra vida, chorou
Por aumentar a perda que se tem ao fim de tudo
Transformando o silêncio, que até então, é mudo
Naquela canção que parece encontrar a razão
Mas que ao final se cala
Frente ao tempo que não para
Frente a nossa lucidez...

(Cidadão Quem)

Resumo

MACHADO, Mírian Ribeiro Galvão. **Bebida de soja fermentada com *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional**. 2007. 101f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A associação de probióticos com extrato de soja, em processos fermentativos, tem sido recomendada para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Dessa maneira é possível minimizar os aspectos limitantes da soja do ponto de vista sensorial e fisiológico, além de disponibilizar um produto diferenciado. A ação potencializada destes dois componentes associados ainda não é conhecida, tanto no comportamento do probiótico em relação ao substrato, quanto aos efeitos benéficos que são destacados na literatura. Este estudo teve por objetivos: a) avaliar a habilidade de crescimento do *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM (LA-NCFM) em extrato de soja, com e sem adição de sacarose, e atingir população mínima compatível com produto probiótico; b) avaliar sensorialmente a bebida de soja fermentada probiótica; c) avaliar a viabilidade celular de LA-NCFM e a estabilidade físico-química da bebida probiótica durante o armazenamento refrigerado; d) demonstrar o efeito da ingestão diária da bebida sobre os níveis de colesterol sanguíneo e crescimento intestinal de LA-NCFM, em hamsters normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos, durante período experimental de 90 dias. Verificou-se que o LA-NCFM apresenta potencial fermentativo em extrato de soja, não havendo necessidade da adição de sacarose para a obtenção de valores adequados de pH (próximo a 4,5), acidez, viscosidade aparente e número de células viáveis. A bebida fermentada com o microrganismo probiótico adicionada de sacarose na concentração de 12% (p/p) é a preferida pelos consumidores. O produto mantém as suas características físico-químicas e prevalência de células viáveis (com índices acima do preconizado pela legislação vigente), durante 28 dias de armazenamento a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. A bebida elaborada com extrato de soja e LA-NCFM não influencia nos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos de hamsters hipercolesterolêmicos, contudo evidencia evitar a formação de lesões ateromatosas cardíacas. As dietas hipercolesterolêmicas resultam em animais com esteatose hepática, peso do fígado aumentado e com menor coeficiente de eficiência alimentar (CEA). As contagens de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* nas fezes dos animais, durante o período experimental, não são influenciadas pelas diferentes dietas administradas, não sendo observada diferenças significativas ($p\leq 0,05$) entre os períodos de coleta e os tratamentos observa-se, porém, prevalência de células de LA-NCFM.

Palavras-chave: extrato de soja; probiótico; *Lactobacillus acidophilus*; colesterol; hamsters.

Abstract

MACHADO, Mírian Ribeiro Galvão. **Soymilk beverage fermented with *Lactobacillus acidophilus*: cellular viability, sensorial evaluation, storage and functional effect.** 2007. 101f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The soymilk association with probiotics, in fermentative processes, has been recommended for functional food development. In this way, it is possible to minimize the restrictive aspects of soy, from the sensorial and physiological point of view, beyond to offer differentiated product. The action of these two components associated not yet is known, as much in the behavior of the probiotic in relation to the substratum, how much to the beneficial effect that are detached in literature. The objectives of this research were: a) to evaluate the growth ability of *Lactobacillus acidophilus* strain NCFM (LA-NCFM), in soymilk, with and without addition of sucrose, and to reach compatible minimum population with probiotic products; b) to evaluate the probiotic fermented soymilk beverage sensorially; c) to evaluate the cellular viability of LA-NCFM and, the physical-chemical stability of the probiotic beverage during the cooled storage; d) to demonstrate the effect of the daily ingestion of the beverage, related to the cholesterol blood levels and intestinal growth of LA-NCFM, in normocholesterolemic and hypercholesterolemic hamsters, during 90 days. LA-NCFM presents fermentative potential in soymilk, and is not necessary the addition of sucrose for the attainment of adequate values of pH (next the 4,5), acidity, apparent viscosity and viable cells count. The probiotic fermented beverage added sucrose in the 12% concentration (w/w) is the preferred for the consumers. The product keeps its physical-chemical characteristics and prevalence of viable cells (with indices above for the current law), of cool storage $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, per 28 days. The probiotic beverage with soymilk and LA-NCFM does not influence in the total cholesterol and triglycerides levels in the blood of hypercholesterolemic hamsters, however it evidences to prevent the aorta's lipidic plaques formation. The hypercholesterolemic diets had resulted in animals with hepatic steatosis, increased in liver weight and least coefficient of alimentary efficiency (CEA). The counting of viable cells of *Lactobacillus acidophilus* in the animals' feces during the experimental period, had not been influenced by the different diets, not being observed significant differences ($p\leq 0,05$) between the periods of collection and the treatments, however it has occurred prevalence of cells.

Key-words: probiotic; soymilk; *Lactobacillus acidophilus*; cholesterol; hamsters.

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Fluxograma da elaboração da bebida de soja fermentada probiótica e de leite fermentado.....	27
Figura 2.2 – Valores de pH durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.....	29
Figura 2.3 - Acidez total (% em ácido láctico) durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição e açúcar (E5%), e leite.....	30
Figura 2.4 - Teor de sólidos solúveis (°Brix) durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.....	31
Figura 2.5 – Densidade (g.mL ⁻¹) durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite...	32
Figura 2.6 - Viscosidade aparente (mPa) durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.....	33
Figura 2.7 - Crescimento de LA-NCFM em extrato de soja sem açúcar (E0%) durante a fermentação.....	34
Figura 3.1 - Ficha de avaliação sensorial utilizada no teste de preferência de bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com a adição de açúcar (BFP5%), e extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF).....	44
Figura 3.2 - Índice de aceitabilidade de bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com a adição de açúcar (BFP5%), e extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF), para os atributos aparência, aroma, textura, sabor e impressão global.....	47
Figura 4.1 - Fluxograma de elaboração da bebida de soja fermentada probiótica	58

Figura 4.2 - Variação de pH, sólidos solúveis (SS em °Brix) e proteínas (%) em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento sob refrigeração a 4±2°C.....	60
Figura 4.3 - Acidez (% ácido láctico) em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento sob refrigeração a 4±2°C.....	61
Figura 4.4 - Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> -NFCM em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento sob refrigeração a 4±2°C.....	62
Figura 5.1 - Vista do experimento no biotério (A) e do hamster recebendo a bebida experimental (B).....	69
Figura 5.2 - Gaiola adaptada com tela para coleta de fezes.....	73
Figura 5.3 - Concentração de colesterol no plasma de hamsters alimentados com dietas experimentais ao final de 90 dias.....	79
Figura 5.4 - Concentração de triglicerídeos no plasma de hamsters alimentados com dietas experimentais ao final de 90 dias.....	81
Figura 5.5 - Fotomicrografia de secções do fígado de hamsters alimentados com dietas experimentais, ao final de 90 dias, em aumento de 20X (A) grupo dieta biotério - R, fígado normal, espaço porta; (B) grupo dieta BP+C, esteatose hepática, espaço porta; (C) grupo com dieta BSP+C, esteatose hepática difusa com foco de necrose; (D) grupo BSP+C, esteatose hepática, alteração da cor.....	83
Figura 5.6 - A) fermentação de açúcares B) coloração de Gram em colônias cultivadas em ágar MRS, provenientes das fezes de hamsters, identificadas como <i>Lactobacillus</i>	85

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Valores médios de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, densidade, viscosidade aparente e número de células viáveis em leite e em extrato de soja sem (E0%) e com a adição de sacarose (E5%), ao final da fermentação e após 28 dias (E28) a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$	35
Tabela 3.1 - Valores médios de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, densidade, viscosidade aparente e número de células viáveis em bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com a adição de açúcar (BFP5%), e em extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF).....	45
Tabela 3.2 - Aceitação de bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com adição de açúcar (BFP5%), e de extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF).....	46
Tabela 3.3 - Valores de pH, sólidos solúveis e acidez titulável de bebida de soja fermentada probiótica elaborada com concentrações de açúcar de 8% (BFP8%), 10% (BFP10%) e 12% (BFP12%), ao final de 8 horas de fermentação, a 37°C	49
Tabela 3.4 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados do teste de preferência - ordenação de bebida de soja fermentada probiótica elaborada com concentrações de sacarose de 8% (BFP8%), 10% (BFP10%) e 12% (BFP12%)	50
Tabela 3.5 - Valores médios do teste de preferência-ordenação de bebida de soja fermentada probiótica elaborada com concentrações de sacarose de 8% (BFP8%), 10% (BFP10%) e 12% (BFP12%).....	50
Tabela 3.6 - Composição físico-química do extrato de soja (ES) e bebida de soja fermentada probiótica (BFP12%).....	51
Tabela 3.7 - Isoflavonas (expressos em agliconas) em extrato de soja e em bebida de soja fermentada probiótica.....	52

Tabela 4.1 - Valores de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, proteínas e viabilidade celular de LA-NCFM, obtidos em intervalos de 7 dias, em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento de 28 dias, a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$	59
Tabela 5.1 - Peso corporal, ganho de peso, ingestão total de ração, consumo diário de ração, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e peso do fígado dos hamsters alimentados com diferentes dietas experimentais	75
Tabela 5.2 - Concentrações (mmol.L^{-1}) de colesterol, triglicerídeos e glicose séricos em hamsters submetidos a diferentes dietas durante 90 dias	78
Tabela 5.3 - Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus</i> (logUFC.mL^{-1}) em fezes de hamsters submetidos a diferentes dietas, em intervalos de 15 dias, durante 90 dias.....	85
Tabela 5.4 - Teor de lipídeos em fezes de hamsters submetidos a diferentes dietas, ao final de 90 dias.....	87

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	
1 Alimentos funcionais.....	4
2 Probióticos.....	6
3 Gênero <i>Lactobacillus acidophilus</i>	10
4 Soja.....	12
4.1 Oligossacarídeos.....	14
4.2 Isoflavonas.....	15
4.3 Extrato de soja.....	18
4.4 Bebidas à base de soja.....	20
CAPÍTULO 2 – FERMENTADO DE SOJA COM POTENCIAL PROBIÓTICO	
1 Introdução.....	22
2 Material e métodos.....	25
2.1 Material.....	25
2.2. Métodos.....	25
3 Resultados e discussão.....	28
4 Conclusão.....	37
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO SENSORIAL DE BEBIDA DE SOJA FERMENTADA COM POTENCIAL PROBIÓTICO	
1 Introdução.....	38
2 Material e métodos.....	40
2.1 Material.....	40

2.2 Experimento e tratamentos.....	40
2.3 Elaboração do extrato de soja e da bebida fermentada probiótica.....	41
2.4 Avaliação sensorial.....	42
2.4.1 Primeira fase: teste de aceitação – escala hedônica.....	42
2.4.2 Segunda fase: teste de preferência – ordenação.....	43
2.5 Avaliação físico-química.....	44
3 Resultados e discussão.....	45
3.1 Aceitação de bebida de soja fermentada probiótica.....	45
3.2 Preferência de bebida de soja fermentada probiótica.....	49
4 Conclusão.....	53

CAPÍTULO 4 - VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus* NCFM EM BEBIDA DE SOJA FERMENTADA PROBIÓTICA DURANTE O ARMAZENAMENTO

1 Introdução.....	54
2 Material e métodos.....	57
2.1 Material.....	57
2.2 Elaboração do extrato de soja e da bebida fermentada probiótica.....	57
2.3 Análise estatística.....	59
3 Resultados e discussão.....	59
4 Conclusões.....	64

CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE BEBIDA DE SOJA FERMENTADA PROBIÓTICA

1 Introdução.....	65
2 Material e métodos.....	68
2.1 Bebida de soja fermentada probiótica.....	68
2.2 Ensaio biológico.....	68
2.2.1 Animais.....	68
2.2.2 Dietas.....	70
2.3 Avaliações bioquímicas.....	71
2.4 Avaliações histopatológicas.....	72
2.5 Avaliações nas fezes	73
2.5.1 Avaliações microbiológicas.....	73
2.5.2 Determinação de lipídeos	74

2.6 Análise estatística.....	74
3 Resultados e discussão.....	74
3.1 Comportamento biológico de hamsters.....	74
3.2 Colesterol sérico total, triglicerídeos e glicemia em hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica	77
3.3 Alterações histopatológicas em hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica	82
3.4 Determinações microbiológicas nas fezes de hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica	84
3.5 Determinação de lipídeos nas fezes dos hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica	86
4 Conclusões.....	87
CONCLUSÕES GERAIS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

INTRODUÇÃO GERAL

É cada vez maior a busca e o consumo de alimentos que contribuam para a melhoria da qualidade de vida, decorrente do conhecimento relativo à importância da relação dieta com a saúde, despertando o interesse por informações sobre alimentos, substâncias e suplementos alimentares que possam trazer consequências benéficas à saúde (PACHECO; SGARBIERI, 1999; PRATES; MATEUS, 2002; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; FRANCO, 2006).

As tendências globais apontando a saúde e o bem-estar como preocupações dos indivíduos têm direcionado os investimentos industriais em alimentos para esses segmentos. São constantes as inovações nesse setor com lançamentos de bebidas, principalmente com soja, que no Brasil têm crescido numa média de 30% ao ano. Da mesma forma, o mercado de probióticos tem apresentado um incremento expressivo. Como exemplo, é crescente o mercado de iogurtes funcionais que movimentou no período de novembro/05 a setembro/06, a quantia de 291 milhões de reais, apresentando um acréscimo de 55% (PARRA, 2007).

Alimentos funcionais têm sido amplamente pesquisados e desenvolvidos no intuito de propiciar alternativas alimentares na prevenção da ocorrência de algumas enfermidades como a hipercolesterolemia que se destaca como importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, uma das principais causas de mortalidade em ocidentais (ROSSI et al., 2000; TARANTO et al., 2000). Neste contexto destacam-se os alimentos à base de soja e os com adição de probióticos (TARANTO et al., 2000; AMORES et al., 2004; GUIMARÃES, 2005).

De modo geral, os benefícios decorrentes da ingestão de probióticos são observados quando estes são consumidos com frequência. A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é uma característica fundamental, devendo alcançar e manter populações elevadas até o momento do consumo para que se observem os efeitos benéficos advindos da sua ingestão. Assim, alimentos probióticos devem conter culturas viáveis em contagens superiores a 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama ou mililitro, pois desta forma, irão alcançar o intestino com um número de células mais elevado resistindo ao suco gástrico e à bile e sobrevivendo a passagem no trato digestivo (BARRETO et al., 2003; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; SAAD, 2006; THAMER; PENNA, 2005).

A associação de bactérias ácido-lácticas com características probióticas em alimentos fermentados é cada vez mais desejável, tendo em vista os potenciais efeitos benéficos à saúde e considerando-se a familiaridade cada vez mais crescente do consumidor com o fato de que estes alimentos contêm microrganismos vivos (GOMES; MALCATA, 1999a; HELLER, 2001). A maioria dos produtos disponíveis no mercado, que apresentam probióticos em sua composição, são alimentos lácteos fermentados, como iogurte, leite acidófilo, *sour cream*, manteiga e leite em pó (PUPIN, 2002).

O extrato de soja tem sido usado como meio de cultura para o crescimento de bactérias ácido-lácticas, além do desenvolvimento de produtos fermentados como o queijo (tofu) e o iogurte de soja (GARRO et al., 1999; CHOU; HOU, 2000; BERNAL, 2004; GARRO; VALDEZ; GIORI, 2004). A presença de oligossacarídeos com potencial prebiótico, como rafinose e estaquiose, permite o crescimento dessas bactérias. A fermentação láctica, pela produção de ácido láctico, acetaldeídos e diacetil, confere características sensoriais agradáveis melhorando o sabor e a aceitabilidade do extrato de soja, além da redução de oligossacarídeos de baixa digestibilidade humana (MORAIS; SILVA, 1996; KAMALY, 1997; GARRO et al., 1999; HOU; YU; CHOU, 2000; HAULY; FUCHS; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2005).

Dentre estas bactérias destaca-se a espécie *Lactobacillus acidophilus* que, além dos benefícios em termos de nutrição e saúde, pode contribuir para melhorar o

sabor do produto final produzindo uma acidificação reduzida durante a armazenagem pós-processamento (GOMES; MALCATA, 1999b; BERNAL; 2004).

Os desafios no preparo de uma bebida probiótica fermentada à base de soja estão baseados em três aspectos principais: 1) a capacidade das bactérias crescerem e atingirem população mínima compatível com produto probiótico; 2) manter a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento refrigerado do produto, bem como haver prevalência no trato digestivo do consumidor; e, 3) ser um produto com boa aceitabilidade sensorial.

Segundo vários autores (GIBSON; FULLER, 2000; JONES, 2002; RODRÍGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003; PADILHA; PINHEIRO, 2004; FRANCO, 2006) é necessária à realização de maior número de pesquisas sobre as substâncias funcionais biologicamente ativas, a fim de que se determine com precisão os efeitos benéficos, níveis mínimos e máximos de ingestão com garantia de eficácia e ausência de risco de toxicidade, além da avaliação da possível ocorrência de efeitos colaterais no uso em períodos prolongados.

A ação potencializada destes dois componentes associados, a soja e os probióticos, ainda não é conhecida, tanto no comportamento do probiótico em relação ao substrato, quanto aos efeitos benéficos que são destacados na literatura. Neste contexto, este estudo teve por objetivos: a) avaliar a habilidade de crescimento do *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM (LA-NCFM) em extrato de soja, com e sem adição de sacarose, e atingir população mínima compatível com produto probiótico; b) avaliar sensorialmente a bebida de soja fermentada probiótica; c) avaliar a viabilidade celular de LA-NCFM e a estabilidade físico-química da bebida probiótica durante o armazenamento refrigerado e d) demonstrar o efeito da ingestão diária da bebida sobre os níveis de colesterol sanguíneo e crescimento intestinal de LA-NCFM, em hamsters normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos, durante período experimental de 90 dias.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1 Alimentos funcionais

É cada vez maior a preocupação da população em evitar ou diminuir o consumo de alimentos que possam ser prejudiciais à saúde, da mesma forma que tem procurado aumentar o consumo de alimentos que contribuam para a melhoria da qualidade de vida. Esse comportamento é resultante do conhecimento da importância da relação dieta com a saúde, despertando o interesse por informações sobre alimentos, substâncias e suplementos alimentares que possam trazer consequências benéficas à saúde (PACHECO; SGARBIERI, 1999; PRATES; MATEUS, 2002; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; FRANCO, 2006). Essa atitude dos consumidores, criando novas oportunidades no mercado de alimentos, associada ao aumento da expectativa de vida bem como da incidência de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis como o diabetes, câncer e doenças cardiovasculares, têm impulsionado as pesquisas no segmento de alimentos funcionais (PARK; KOO; CARVALHO, 1997; PADILHA; PINHEIRO, 2004; FRANCO, 2006).

São considerados alimentos funcionais aqueles “alimentos que contêm ingredientes ou componentes capazes de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônico-degenerativas, além das suas funções nutricionais básicas”. Um alimento funcional deve apresentar uma ou mais substâncias que exerçam ação positiva na modulação e ativação dos processos metabólicos, melhorando dessa maneira as condições de saúde. Os efeitos da ingestão de alimentos funcionais resultam em maior bem-estar físico, na melhoria do

sistema imune, prevenção do aparecimento precoce de alterações patológicas e de doenças degenerativas (PACHECO; SGARBIERI, 1999; PUPIN, 2002; THAMER; PENNA, 2005; FRANCO, 2006; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SAAD, 2006).

Dentre as principais ações dos alimentos funcionais destacam-se a fisiologia do trato digestivo, o sistema antioxidante e o metabolismo de macro e micronutrientes. Essas ações estão relacionadas à flora microbiana com suas funções e modulação, à imunidade, à biodisponibilidade de micronutrientes, reações de defesa contra o estresse oxidativo e a redução de efeitos patológicos e de doenças crônico-degenerativas (PARK; KOO; CARVALHO, 1997; MAZZA, 1998; PRATES; MATEUS, 2002; RODRÍGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003).

Ao buscar-se analisar os marcos legais acerca de alimentos funcionais, foi constatado que somente o Japão possui uma definição legal e regulamentação própria para essa categoria de produto. Os demais países pesquisados (Austrália, Canadá, Estados Unidos, Japão e países da Comunidade Européia) apresentam como critério de avaliação o embasamento de alegações em estudos científicos relevantes, e a exigência de segurança do produto sem a necessidade de supervisão médica. O Brasil foi o primeiro país da América Latina a possuir uma legislação sobre alimentos/ingredientes com características especiais, ou alegação de propriedades funcionais ou de saúde, sem no entanto ter uma regulamentação própria para “alimentos funcionais” como ocorre no Japão (FRANCO, 2006).

A maior parte dos alimentos funcionais caracterizados é de origem vegetal, embora existam alguns de origem animal reconhecidos pelos seus efeitos benéficos. Complementarmente, há a categoria dos alimentos probióticos, constituída pelos que contêm microrganismos com propriedades benéficas ao hospedeiro.

Os principais ingredientes ou substâncias bioativas responsáveis pela funcionalidade dos alimentos podem ser classificados quanto à natureza química e molecular em isoprenóides (carotenóides, saponinas, tocoferóis, tocotrienos e terpenos simples); compostos fenólicos (cumarinas, taninos, lignina, antocianinas, isoflavonas, flavonóides); proteínas, aminoácidos e afins (isotiocianatos, folato,

colina, compostos alil sulfurados); carboidratos e derivados (ácido ascórbico, oligossacarídeos, polissacarídeos não amiláceos); ácidos graxos e lipídeos (PUFA, ômega-3, esfingolipídeos, lecitina); minerais (Ca, Se, K, Cu, Zn) e microbiológicos (probióticos) (PARK; KOO; CARVALHO, 1997; MAZZA, 1998; PRATES; MATEUS, 2002; PADILHA; PINHEIRO, 2004; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; FRANCO, 2006).

Dentre os alimentos mais pesquisados contendo ingredientes ou substâncias bioativas destacam-se a aveia (β -glucanas, psyllium), o alho (alicina), o tomate (licopeno), a soja (isoflavonas, proteína), a linhaça (ômega-3, ligninas), as frutas cítricas (flavonóides, linonóides), o vinho tinto e uva (flavonóides, fenóis, resveratrol), o peixe e óleo de peixe (ômega-3), os prebióticos (inulina, frutooligossacarídeos) e os probióticos (Bifidobactérias, Lactobacilos) (PACHECO; SGARBIERI, 1999; JONES, 2002; RODRÍGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; FRANCO, 2006).

Considerando os benefícios que podem trazer à saúde, os alimentos probióticos são um excelente campo de pesquisa na área de ciência e tecnologia de alimentos. Apesar disto, Franco (2006) destaca a importância da segurança na adição de componentes bioativos ou eliminação/redução da quantidade de uma substância, devendo seguir rigorosos critérios científicos. É necessária a realização de maior número de pesquisas sobre as substâncias ou organismos biologicamente ativos, a fim de se validar os efeitos benéficos, os níveis mínimos e máximos de ingestão com garantia de eficácia e ausência de risco de toxicidade, além da avaliação da possível ocorrência de efeitos colaterais com o uso continuado (JONES, 2002; RODRÍGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003; PADILHA; PINHEIRO, 2004; FRANCO, 2006).

2 Probióticos

Probiótico é uma palavra de origem grega e significa “para a vida”. Os benefícios potenciais da microbiota intestinal são conhecidos desde o século XIX, mas o interesse pelos mesmos aumentou a partir de 1960 (MITSUOKA, 1978; GOMES; MALCATA, 1999a; SHORTT, 1999; BROMBERG, 2003).

Elie Metchnikoff, em 1907, na sua publicação *The Prolongation of Life* propôs uma racionalização científica para os efeitos benéficos das bactérias presentes no iogurte, quando postulou que estas suprimiam a fermentação putrefativa na flora intestinal e que o seu consumo desempenhava função importante na manutenção da saúde. Suas suposições, associando a saúde e a longevidade de camponeses búlgaros com a ingestão de um produto lácteo fermentado por microrganismos considerados benéficos, estimularam o interesse científico. Desde então, vários pesquisadores têm procurado conhecer e caracterizar as funções dos microrganismos benéficos para a saúde que habitam o trato digestivo, e mais precisamente em produtos lácteos fermentados (SHORTT, 1999; AMORES et al., 2004; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006).

Os probióticos são conceituados como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002). Um conceito mais abrangente considera como probióticos “suplementos microbianos que influenciam positivamente no organismo, e aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, através do equilíbrio microbiano intestinal e das funções fisiológicas do trato intestinal humano, quando administrados em doses adequadas” (GOMES; MALCATA, 1999a; PENNA, 2002; BROMBERG, 2003; AMORES et al., 2004; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006; SAAD, 2006).

Existem vários critérios de seleção de linhagens probióticas para o uso na alimentação humana, porém é de consenso que devem ser de origem humana e não patogênicas, possuir tolerância aos ácidos e à bile durante passagem intestinal, capacidade de aderência, habilidade de colonização, atividade antagonista aos patógenos entéricos, além de efeitos benéficos à saúde (MITSUOKA, 1978; BROMBERG, 2003; AMORES et al., 2004; SAAD, 2006).

Estudos relatam benefícios potenciais de promoção da saúde como resultado da ingestão de probióticos. Dentre esses benefícios destaca-se o equilíbrio da flora intestinal; a melhoria da mobilidade intestinal e redução da atividade enzimática fecal; o aumento da absorção de nutrientes; a prevenção e/ou controle

de infecções intestinais; a prevenção e tratamento da diarreia por rotavírus; a modulação do sistema imune; a prevenção e/ou inibição de câncer (câncer colôn-retal, câncer de mama); a redução do colesterol; melhor digestão da lactose; a proteção em infecções do trato urinário; a prevenção a alergias; prevenção a cáries; a prevenção e redução de enfermidades inflamatórias intestinais (colite ulcerosa, bursite crônica, doença de Crohn); a redução de hipersensibilidade e de patógenos competidores (ESCALANTE, 2001; PUPIN, 2002; BROMBERG, 2003; DRISKO; GILES; BISCHOFF, 2003; AMORES et al., 2004; BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006; FRANCO, OLIVEIRA, CARVALHO, 2006; SAAD, 2006).

Os benefícios decorrentes da ingestão de probióticos são observados quando há consumo frequente, sendo necessária concentração mínima de células viáveis de 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro do produto para que se obtenha número relevante desses microrganismos na composição da microbiota intestinal. Em contrapartida, é comum haver diminuição da contagem fecal microbiana quando cessa o consumo do alimento contendo probiótico. Desse modo, para manter um número elevado de microrganismos viáveis no trato digestivo, a ingestão diária mínima recomendada é de 100 gramas de produto contendo 10^9 UFC (GOMES; MALCATA, 1999b; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; BROMBERG, 2003; THAMER; PENNA, 2005; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SAAD, 2006).

Embora se conheçam relações de ação-resposta os mecanismos de ação dos probióticos ainda não estão totalmente elucidados. Dentre os mecanismos mais aceitos, destacam-se: a) competição por sítios de ligação (promovem o bloqueio dos sítios e/ou receptores na mucosa entérica, reduzindo a área de interação das bactérias patogênicas); b) produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e ácido láctico); c) competição por nutrientes; d) efeito imunomodulador (aumento da produção de anticorpos e citocinas, ativação de macrófagos, estímulo da atividade fagocitária, produção de interferon e proliferação de células T e NK); e) metabolismo acelerado de nutrientes específicos (açúcares, vitaminas e aminoácidos são metabolizados e tornam-se indisponíveis aos patógenos); f) aumento da área de absorção do intestino delgado (favorecem a recuperação e absorção de Ca, Fe, vitamina K e grupo B); g) ação de

enzimas bacterianas (ação de eubactérias benéficas, diminuição da síntese de compostos carcinogênicos) (MITSUOKA, 1978; PENNA et al., 2000; ESCALANTE, 2001; DRISKO; GILES; BISCHOFF, 2003; AMORES et al., 2004; FRANCO, OLIVEIRA, CARVALHO, 2006; SAAD, 2006).

Além dos benefícios nutricionais os probióticos podem também contribuir para a qualidade tecnológica, devido a menor acidificação e pós-acidificação no produto, resultando em prolongamento da vida útil. Além disso, ocorre a formação de metabólitos como ácido láctico, ácido propiônico, diacetil e outras substâncias antagonísticas que exercem efeito inibitório frente a bactérias Gram-negativas, principais responsáveis pela deterioração do produto. Um bom probiótico deve manter suas propriedades durante o processo tecnológico a que é submetido o alimento bem como durante o seu armazenamento (GOMES; MALCATA, 1999b; RODAS et al., 2001; PUPIN, 2002; BROMBERG, 2003; OLIVEIRA; DAMIN, 2003; FERREIRA, 2005; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SAAD, 2006). Modernos processamentos permitem a obtenção de produtos fermentados com excelente sabor e altas contagens microbianas. No mercado japonês, por exemplo, encontram-se fermentados com 4×10^{10} UFC.g⁻¹ de produto, enquanto na maioria dos demais mercados obtém-se 10^7 UFC por grama ou mL (SHORTT, 1999).

Dentre os microrganismos mais empregados como probióticos para consumo humano destacam-se as bactérias lácticas em grande número de gêneros e espécies. No gênero *Lactobacillus* destacam-se *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei* – subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. salivarius* (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; SAAD, 2006). Além dos *Lactobacillus*, outros microrganismos têm sido utilizados comercialmente, principalmente na produção de queijos e na fermentação de leite ou outras matérias-primas, como é o caso de *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (AMORES et al., 2004; FERREIRA, 2005; THAMER; PENNA, 2005; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SAAD, 2006).

As bactérias ácido-lácticas, além das características sensoriais relativas ao sabor e textura, e ao aumento do valor nutricional, são usadas como bioconservadores devido à produção de bacteriocinas. São importantes na indústria

alimentícia, pois são conservadores biológicos e não formam compostos indesejáveis durante sua degradação, característica importante quando não é permitida a utilização de aditivos no alimento (OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA; DAMIN, 2003; FERREIRA, 2005; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006).

3 Gênero *Lactobacillus acidophilus*

O *Lactobacillus acidophilus* é um bastonete gram-positivo, não esporulado, desprovido de flagelos, catalase negativo, homofermentativo (com o ácido láctico na configuração DL), microaerófilo (tendo seu crescimento favorecido em anaerobiose ou em pressão reduzida de oxigênio, com 5 a 10% de gás carbônico), com temperatura ótima de crescimento na faixa de 35°C a 40°C, podendo desenvolver-se até 45°C. O pH ótimo de crescimento é de 5,5 a 6,0 e tolera acidez na faixa de 0,3% a 1,9%, é resistente à acidez gástrica e aos sais biliares, com taxa de sobrevivência no trato gastrintestinal (TGI) estimada entre 2% e 5%. A capacidade de aderência ao intestino é variável (GOMES; MALCATA, 1999b; GUEDES NETO et al., 2002; TOMELIN; PEPLAU, 2005).

Os meios de cultura mais indicados para contagem e identificação de *Lactobacillus acidophilus* são MRS (De Man, Rogosa, Sharpe), MRS-maltose, MRS-salicina, HHD (Homofermentative Heterofermentative Differential) e LA (Modified Bifidus Blood Agar). Os meios MRS, MRS-maltose, MRS-salicina e LA, apresentam boa correlação sendo equivalentes na contagem e identificação de *Lactobacillus acidophilus* em amostras de produtos probióticos. Apesar de MRS não ser um meio diferencial, permite boa distinção das demais cepas presentes através das características das colônias que apresentam cor branca com aspecto leitoso, além do custo acessível (SHAH, 2001; BARRETO et al., 2003; BARRETO et al., 2004).

O emprego de *Lactobacillus acidophilus* em produtos fermentados comerciais está amplamente difundido, podendo ser utilizado isoladamente ou em associação com outros microrganismos. Essa utilização está associada às propriedades terapêuticas, dentre as quais se destacam a reposição de microbiota intestinal, desejável após uso prolongado de antibióticos; a atuação contra bactérias

indesejáveis como *Helicobacter pylori*; a redução dos níveis plasmáticos de colesterol e de doenças coronarianas; a redução da ocorrência de doenças do trato urinário inferior como cistite e vaginite; a biodegradação de nitrosaminas carcinogênicas no intestino; o aumento da absorção de lactose em pessoas intolerantes; o efeito imunomodulador; o tratamento de infecções e de diarreias causadas por leveduras (GOMES; MALCATA, 1999a; GUEDES NETO et al., 2002; SAAD, 2006).

As linhagens de *Lactobacillus acidophilus* utilizadas em maior escala como probióticas são NCFM, LA1, LA2, LAC4, LA5, DDS-1, SBT-2026, NCFB 1748, as quais têm evidenciado bom desempenho e propriedades tecnológicas favoráveis (ESCALANTE, 2001; SHAH, 2001). O *Lactobacillus acidophilus* da linhagem NCFM (LA-NCFM) foi isolado de fezes de lactentes, sendo produzido comercialmente desde 1972, tendo seu genoma recentemente seqüenciado e parcialmente analisado *in silico*. É a menor bactéria probiótica gram-positiva que reside no TGI. O LA-NCFM tem em comum com outros lactobacilos habitantes do TGI a característica de ser altamente auxotrófico, faltando a capacidade de síntese da maioria dos aminoácidos, vitaminas e cofatores. Essa deficiência é compensada pela presença de genes codificadores da via fermentativa e do transporte de proteínas. Diferentemente das outras bactérias ácido-láticas não apresenta prófagos completos (SANDERS e KLAENHAMMER, 2001; ALTERMANN et al., 2005; TÁRRAGA et al., 2005). Adicionalmente, apresenta características fundamentais para microrganismos probióticos como diversas proteínas de superfície para adesão à mucosa intestinal, produção da bacteriocina Lactacina B (classe II) com atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Clostridium perfringens*. É capaz de metabolizar além de carboidratos simples, os mais complexos como rafinose e frutooligossacarídeos. Foram identificados, *in silico*, sistemas de transporte para trealose, frutose, glicose, manose, melobiose, gentiobiose, celobiose, salicina, rafinose e maltose. No entanto, o LA-NCFM, através de análise *in silico* de seu genoma, parece não ter genes envolvidos no aproveitamento de sacarose (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; BARRANGOU et al., 2003; ALTERMANN et al., 2005; TÁRRAGA et al., 2005).

4 Soja

A soja foi introduzida no Brasil em 1908, mas o interesse comercial pelo grão surgiu no final da década de 60. Com a explosão do preço da soja no mercado mundial, em meados de 1970, os agricultores e o próprio governo brasileiro aumentaram seu interesse por esta cultura. Atualmente, essa leguminosa ocupa lugar de destaque na economia agrícola mundial, tendo como líderes na produção Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai. O Brasil é o segundo maior produtor de grãos de soja, tendo atingido 60 milhões de toneladas na safra 2006/2007, representando 26% da produção mundial, e no País, o complexo agroindustrial da soja movimenta anualmente U\$30 bilhões (EMBRAPA SOJA, 2007).

Considerada a variabilidade em função do genótipo e das condições edafoclimáticas, a soja, em média, apresenta a seguinte composição geral (m/m, matéria seca) proteínas 40,2%, lipídeos 21%, carboidratos 33,9% e cinzas 4,9%. Cerca de 90% das proteínas são globulinas e apresentam bom equilíbrio aminoacídico sendo limitantes em metionina e cistina (aminoácidos sulfurados). Os lipídeos apresentam ácidos graxos saturados e insaturados nos percentuais de 15% e 85%, respectivamente. Dos carboidratos, proporção considerável não é facilmente digerível por monogástricos (galactanas, pentosanas, hemicelulose e celulose), sendo 8% do total de açúcares correspondentes à sacarose, seguida de estaquiose e rafinose. É rica em minerais, em especial magnésio, fósforo, ferro, cobre, zinco, potássio, manganês e moderadamente em cálcio. É fonte de vitaminas lipossolúveis como E e K, além de hidrossolúveis, principalmente as do complexo B (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994; MORAIS; SILVA, 1996; LIU, 1999; EMBRAPA SOJA, 2007).

O grão de soja é bastante versátil, originando produtos e subprodutos que são usados em vários setores agroindustriais e da indústria química. Na alimentação humana pode ser usado na forma direta, em associação com outros alimentos da dieta ou como ingrediente principal. Farinhas, proteínas isoladas e concentrados protéicos são subprodutos de soja amplamente utilizados na composição de vários alimentos como embutidos, chocolates, temperos para saladas, ingrediente base em

bebidas, produtos de panificação, alimentos infantis e dietéticos (GUIMARÃES, 2005; EMBRAPA SOJA, 2007).

A utilização da soja em nutrição humana requer a inativação de fatores antinutricionais. Dentre as substâncias antinutricionais destacam-se: inibidores de proteases (antitripsinas), lectinas, fatores goitrogênicos e antivitaminicos, fitatos, saponinas e outras substâncias que embora não nutrientes podem trazer conseqüências negativas ou efeitos indesejáveis como os oligossacarídeos geradores de flatulência. Algumas são termolábeis (inibidores da tripsina, hemaglutininas, fator bocígeno, antivitaminas e fitatos), porém outras são termoestáveis (saponinas, fatores flatulentos, lisinoalanina e alérgenos) (MORAIS; SILVA, 1996, WILLE; PEDROZO; FREITAS, 2004).

A soja não se destaca apenas pelas proteínas de alta qualidade nutricional, mas também por estar associada à prevenção e a ação terapêutica, reduzindo o risco de algumas doenças crônicas e degenerativas como doenças cardiovasculares (DCV), alguns tipos de câncer (mama, útero, próstata), osteoporose, além de alívio dos sintomas da pós-menopausa. A ingestão diária de 25g de proteína de soja, que corresponde à aproximadamente 60g de grãos de soja, é recomendada para o controle dos níveis de colesterol e triglicerídeos (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994; HASLER, 1998; CHOU; HOU, 2000; RODRIGUES, 2003; ZHOU, 2004; MA et al., 2004; WILLE; PEDROZO; FREITAS, 2004; GUIMARÃES, 2005; EMBRAPA SOJA, 2007).

Condições de cultivo e de colheita, tipo de cultivar, estágio de maturação, condições de estocagem e processamento são fatores que alteram as características físico-químicas das proteínas da soja, principalmente viscosidade, capacidade de formação de gel e emulsificação. As propriedades tecnológicas dos produtos protéicos de soja variam de acordo com o grau de desnaturação das proteínas, havendo correlação inversa entre drasticidade do tratamento e solubilidade das proteínas (CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV; MANDARINO, 2006; GOÉS-FAVONI, 2007). Dentre os compostos responsáveis pelo sabor da soja encontram-se as saponinas, as isoflavonas e os compostos voláteis, derivados enzimaticamente ou termicamente de precursores não voláteis como proteínas,

peptídeos, aminoácidos, carboidratos, glicosídeos, lipídeos e vitaminas, além dos compostos não voláteis como derivados de lipídeos, compostos fenólicos e açúcares. A adstringência, resultante das saponinas, pode ser reduzida pela remoção mecânica do hipocótilo. As isoflavonas provocam amargor e adstringência podendo serem reduzidas pelo tratamento térmico, juntamente dos lipídeos que conferem sabor mais acentuado. Além destas alternativas tem-se o melhoramento genético que pode obter genótipos com sabor suave, pela supressão de lipoxigenases (ARAÚJO; CARLOS; SEDYAMA, 1997).

Os atributos sensoriais são os principais fatores de rejeição do consumidor frente à utilização da soja ou produtos derivados na alimentação humana. Soma-se a isso os preconceitos relativos à segurança do produto e a absorção de cálcio, além da presença de oligossacarídeos não-digeríveis, tais como estaquiose e rafinose. Estes oligossacarídeos provocam flatulência em indivíduos sensíveis, e dor abdominal (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994). O conjunto desses fatores contribui para que grande parte da soja seja utilizada na extração de óleo e a fração sólida seja destinada especialmente à alimentação animal. Entretanto, a soja e seus derivados constituem-se em matérias-primas altamente promissoras para uso na indústria de alimentos na forma direta ou em formulações. A adição apropriada de derivados de soja pode resultar em produtos menos calóricos, com reduzido teor de lipídeos, elevado teor de proteínas, atendendo às necessidades nutricionais e sendo acessíveis economicamente. Mesmo com o desenvolvimento de variedades direcionadas ao consumo humano, como por exemplo, maior teor de proteína e alta concentração de isoflavonas (BRS-216), e com ausência de lipoxigenases (BRS-213), a sua utilização é incipiente (RODRIGUES, 2003; GUIMARÃES, 2005; SILVA et al., 2006).

4.1 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são carboidratos comumente presentes em alimentos como grãos, frutas, hortaliças, leite e mel, formados de três a dez unidades de monômeros de hexoses e que podem ser encontrados na forma livre ou combinados. Os oligossacarídeos, além da função nutricional e edulcorante, exibem atividade fisiológica, sendo denominados de ingredientes funcionais. Eles melhoram

a qualidade dos alimentos, promovendo modificação no sabor e nas características físico-químicas, além de propriedades benéficas para a saúde, como estimular a atividade de *Bifidobacterium* no trato intestinal (ALMEIDA; PASTORE, 2001). Na soja os oligossacarídeos que se destacam são a rafinose e estaquiose, que contém ligações α -glicosídicas e β -frutosídicas, correspondendo a 63% e 5% do total, respectivamente. Nos produtos derivados de soja, o percentual é variável em função do tipo de processamento (LIU, 1999).

Humanos e animais monogástricos são deficientes em α -galactosidases pancreáticas, enzimas que realizam a hidrólise desses oligossacarídeos. Em consequência, esses carboidratos não digeridos no duodeno alcançam o intestino grosso sendo metabolizados pelas bactérias intestinais produzindo gás. Esse é o caso de *Clostridium* spp. e *Bacteroides* spp., produtoras de quantidades consideráveis de metano, gás carbônico e hidrogênio. O acúmulo anormal de gases flatulentos retais provoca aflição gastrintestinal em indivíduos sensíveis, provocando dor abdominal, náuseas, diarreia e aumento da peristalse (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994; MORAIS; SILVA, 1996; LIU, 1999; SILVESTRONI et al., 2002; MA et al., 2004). Por outro lado, os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, apresentam potencial prebiótico, sendo utilizados como substrato adequado para o crescimento de bactérias ácido-lácticas, as quais são amplamente utilizadas na fermentação de iogurtes, queijos e bebidas. A fermentação láctica, pela produção de ácido láctico, acetaldeído e diacetil, confere características sensoriais agradáveis melhorando o sabor e a aceitabilidade do extrato de soja, além da redução desses oligossacarídeos (GIBSON; WILLIS; LOO, 1994; MORAIS; SILVA, 1996; KAMALY, 1997; GARRO et al., 1999; HOU; YU; CHOU, 2000; QUICAZÁN; SANDOVAL; PADILLA, 2001; HAULY; FUCHS; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2005).

4.2 Isoflavonas

As isoflavonas da soja são compostos não nutrientes, com atividades biológicas promotoras da saúde devido as propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e hipocolesterolêmicas (BARBOSA et al., 2006). As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides, que se apresentam em 4 formas químicas, dependendo do radical que estiver ligado ao anel de benzeno,

somando assim 12 isômeros ou diferentes formas de isoflavonas: os β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina); as agliconas (daidzeína, genisteína, e gliciteína); os conjugados malonil-glicosídeos (6"O-malonil-daidzina, 6"O-malonil-genistina e 6"O-malonil-glicitina) e os conjugados acetil-glicosídeos (6"O-acetil-daidzina, 6"O-acetil-genistina e 6"O-acetil-glicitina) (LIU, 1999; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; MANDARINO; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV; 2006; GÓES-FAVONI, 2007).

A concentração de isoflavonas no grão de soja é variável e está relacionada a diferenças genéticas entre cultivares, temperatura durante o desenvolvimento do grão, condições climáticas, local e ano de cultivo. A maior concentração de isoflavonas está no hipocótilo ou gérmen e não são encontradas no tegumento (ARAÚJO; CARLOS; SEDYAMA, 1997; GÓES-FAVONI et al., 2004; MANDARINO; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV, 2006; GÓES-FAVONI, 2007).

Mandarino; Carrão-Panizzi; Crancianinov (2006) avaliaram o teor de isoflavonas, por cromatografia líquida, em amostras de 17 cultivares de soja desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético da EMBRAPA, semeadas em outubro, novembro e dezembro, safra 2004/2005. A cultivar BRS-213 apresentou um teor total de isoflavonas nas amostras, em mg/100g, de 191,63; 145,18 e 104,90, nos meses de outubro, novembro e dezembro, respectivamente.

Durante as etapas de processamento dos derivados protéicos da soja, como farinhas, isolados, concentrados e texturizados protéicos, bem como extratos hidrossolúveis, podem ocorrer perda de algumas isoflavonas e também mudanças no seu perfil. Na soja não processada, as principais isoflavonas são os β -glicosídeos genistina e daidzina (50% a 90% do total) e as formas conjugadas malonil-genistina e malonil-daidzina, que são transformadas para outras formas durante o processamento, tais como acetilglicosídeos e agliconas (ARAÚJO; CARLOS; SEDYAMA, 1997; GÓES-FAVONI et al., 2004; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV; MANDARINO, 2006; BARBOSA et al., 2006).

A presença e a concentração de isoflavonas dependem das condições de processamento, principalmente a temperatura. O teor de isoflavonas na maioria dos

alimentos à base de soja varia de 100 a 300mg/100g. Produtos não fermentados têm concentração 2 a 3 vezes maiores que os fermentados, entretanto a distribuição dos constituintes difere nesses dois grupos: produtos não fermentados apresentam predominantemente β -glicosídeos enquanto os fermentados apresentam maiores concentrações de agliconas, devido ao aumento na atividade da enzima β -glicosidase (GÓES-FAVONI et al., 2004; MANDARINO; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV, 2006; GÓES-FAVONI, 2007). Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência do tratamento hidrotérmico na formação de agliconas em grãos de soja. Como a hidratação é uma prática comum no processamento de diversos alimentos à base de soja, constitui-se em importante procedimento na formação e retenção de agliconas, as quais constituem as formas de isoflavonas biologicamente ativas e mais biodisponíveis (GÓES-FAVONI, 2007).

A presença de isoflavonas agliconas no grão está relacionada à atividade da enzima β -glicosidase presente no tecido vegetal que, em condições adequadas de temperatura e umidade, promove a hidrólise dos β -glicosídeos. A forma aglicona possui sabor mais intenso e desagradável que a forma glicosídica. A formação de agliconas pode ser reduzida pela utilização de inibidores no controle da atividade de β -glicosidase, diminuindo-se desta maneira o sabor amargo e adstringente em produtos derivados de soja (ARAÚJO; CARLOS; SEDYAMA, 1997; GÓES-FAVONI et al., 2004).

A capacidade antioxidante das isoflavonas está relacionada ao número de grupos hidroxila presentes na sua estrutura química, decrescendo com a glicosilação e/ou com a substituição do grupo hidroxila pelo metoxila. Por isso no desenvolvimento de produtos alimentícios é necessário conhecer-se, além do teor de isoflavonas, os métodos que promovam a manutenção do potencial antioxidante nos derivados (BARBOSA et al., 2006).

Clinicamente, as isoflavonas são indicadas na pós-menopausa e na prevenção e tratamento da osteoporose devido à similaridade química ao estradiol. O uso de isoflavonas na reposição hormonal tem melhorado os sintomas clínicos da pós-menopausa como fogachos, depressão, vertigem, tontura e formigamento. Após

a ingestão, são hidrolisadas pelas glucosidases intestinais, liberando as agliconas que podem ser absorvidas ou metabolizadas em vários p-etilfenol. A meia-vida plasmática das agliconas daidzeína e genisteína é de 7 a 9 horas em adultos, e a concentração máxima ocorre em 6 a 8 horas após a ingestão (BERTEI; FAGUNDES, 2006). As isoflavonas estão também envolvidas na atividade anticarcinogênica, redução da perda de massa óssea, e diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo total e LDL-colesterol, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares. O consumo de 25g por dia de proteína de soja é recomendado na redução do colesterol sanguíneo. Esse mesmo resultado é obtido com a ingestão de 50mg por dia de isoflavonas, recomendando-se elevar a dose para 100mg durante o climatério. A ingestão diária de 400mL de extrato de soja contendo 76mg de isoflavonas previne a perda de massa óssea em mulheres na pós-menopausa, e a ingestão de 40mg a 80mg atua na prevenção de doença cardiovascular e fogachos da menopausa (GÓES-FAVONI et al., 2004; MA et al., 2004; BERTEI; FAGUNDES, 2006).

A biodisponibilidade e o metabolismo das diferentes isoflavonas dependem de sua forma química, sendo as agliconas, sobretudo a genisteína, a isoflavona mais ativa na prevenção de diversos tipos de câncer hormônio-dependentes (câncer de mama, colo de útero e próstata). A microbiota intestinal é capaz de metabolizar as isoflavonas conjugadas em agliconas (GÓES-FAVONI et al., 2004; MA et al., 2004; MANDARINO; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV, 2006).

4.3 Extrato de soja

O “extrato solúvel” de soja, também chamado “leite de soja”, é o produto obtido por extração aquosa dos grãos de soja. Nesse extrato, que de fato não é uma solução verdadeira, encontram-se proteínas e carboidratos em suspensão, os lipídeos em emulsão, alguns minerais e açúcares em solução. O extrato é normalmente obtido a partir de grãos de soja através de processo que consiste em descascamento, hidratação, desintegração à quente, suspensão em água, cozimento e filtração (REDDY; MITAL, 1992; MORAIS; SILVA, 1996; HOU; YU; CHOU, 2000; RODRIGUES, 2003). Consideradas as variações inerentes à matéria-prima e ao processo tecnológico utilizado, que refletem na composição química e nas características físicas e sensoriais, o extrato de soja contém em média, a cada

100g, 0,4-0,2g de carboidratos, 2,0-3,5g de proteínas, 0,3-1,9g de lipídeos, 15-70mg de cálcio, 30-105mg de fósforo, 1,2-3mg de ferro, 40 μ g de tiamina, 120 μ g de riboflavina, e 0,1mg de niacina (FRANCO, 1986; REDDY; MITAL, 1992; RODRIGUES, 2003).

As isoflavonas estão presentes em extratos de soja principalmente como β -glicosídeos. No processamento do extrato aquoso ocorrem perdas insignificantes de isoflavonas para o resíduo insolúvel (okara) sugerindo a associação dessas a outros compostos, provavelmente proteínas. A fonte de matéria-prima para a obtenção do extrato também influencia a composição, pois os extratos obtidos a partir de isolados protéicos de soja apresentam 4 vezes menos isoflavonas do que aqueles produzidos de grãos (WANG; MURPHY, 1996, GÓES-FAVONI et al.; 2004). Temperaturas elevadas, de 85°C a 130°C, no processamento de extratos de soja comerciais promovem aumento no teor de β -glicosídeos, devido à desesterificação dos conjugados malonil passando a β -glicosídeos. Isso explica o fato de grãos de soja apresentarem 21% do total de isoflavonas como β -glicosídeos enquanto extratos contem cerca de 62% (TODA et al., 2000; GÓES-FAVONI et al.; 2004).

Foram analisados os teores de isoflavonas em alguns produtos comerciais de soja como farinha, proteína texturizada, formulados infantis e extratos. Estes últimos apresentaram valores médios (em mg.100g⁻¹) equivalentes a 91,3 de daidzina; 108,5 de genistina; 10,5 daidzeína; 9,3 genisteína; 28,3 malonil-daidzina; 44,6 malonil-genistina, e um total de 180mg em agliconas, para extratos de soja em pó de grãos descascados (GÓES-FAVONI et al.; 2004).

O potencial do extrato de soja, como um substituto para o leite bovino ou humano, tem sido realçado através dos anos, especialmente no caso de recém nascidos e crianças alérgicas ao leite bovino, ou intolerância à lactose. Pode, também, ser usado como fonte protéica de baixo custo quando há indisponibilidade do leite bovino. O extrato de soja vem ganhando espaço no mercado nacional em virtude dos diversos tipos de produtos disponíveis e apelo quanto aos efeitos benéficos nutricionais e prevenção de algumas doenças (MORAES, 2002; RODRIGUES, 2003; GUIMARÃES, 2005).

Embora estudos tenham evidenciado o aumento no consumo do extrato de soja, ainda há limitações tecnológicas especialmente no que concerne as características sensoriais devido a percepção de sabores indesejáveis provenientes do extrato ou formados durante o processamento (MORAES, 2002; RODRIGUES, 2003, QUICAZÁN; SANDOVAL; PADILLA, 2001; CUENCA; QUICAZÁN, 2004).

Durante o processamento do extrato de soja, a partir de grãos, são formados aldeídos, acetais, ésteres, compostos sulfurados, hidrocarbonetos, compostos aromáticos, cetonas, álcoois, dentre outros. Os sabores estranhos em produtos de soja são normalmente descritos como similares a herbáceo, sabor a feijão cru e/ou amargo. Os sabores herbáceos ou típicos da soja crua aparecem devido ao rompimento do grão e à ação de enzimas lipoxidases e lipoxigenases. Os sabores amargos são resultantes de aminoácidos, devido à ação proteolítica e oxidativa, além de saponinas e isoflavonas presentes na matéria-prima (MARFO et al., 1990; MORAES, 2002).

Processos fermentativos com vários organismos têm sido pesquisados como alternativa para melhorar o sabor e aumentar a aceitabilidade do extrato de soja. Estudos comprovaram que o extrato de soja é um substrato adequado para o crescimento e atividade de bactérias ácido-lácticas comumente utilizadas na preparação de produtos como iogurtes, queijos e bebidas (KAMALY, 1997; GARRO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; CUENCA; QUICAZÁN, 2004; GARRO; VALDEZ; GIORI, 2004).

4.4 Bebidas à base de soja

A demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis, inovadores, seguros, com praticidade de consumo, impulsionou a expansão de produtos como iogurtes líquidos e outras bebidas lácteas, bebidas à base de soja, bebidas isotônicas e energéticas (THAMER; PENNA, 2006).

Neste contexto, as bebidas à base de soja vêm apresentando significativo crescimento de vendas, movidas por um interesse cada vez maior do consumidor por produtos com apelo funcional. Nesse caso as bebidas ainda apresentam a

vantagem de serem fonte de vitaminas, proteínas e sais minerais podendo ser ingeridas por pessoas que apresentam alergia ou intolerância ao leite bovino (WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994; PEREIRA, 2002; LÓPEZ, 2003; BORRMANN et al., 2006).

A produção de produtos similares a iogurtes, mediante o uso de fermentação láctica, utilizando o extrato de soja puro ou em misturas com leite bovino ou de outros mamíferos, é uma alternativa interessante para substituir proteínas animais, ou para a produção de iogurtes “vegetarianos” (TAMIME; ROBINSON, 1988; WANG; ASCHERI, 1991; WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994; CUENCA; QUICAZÁN, 2004).

O “iogurte de soja” é um produto obtido da fermentação do extrato aquoso de soja, de boa aceitabilidade e custo reduzido, porém deficiente em minerais, principalmente cálcio. Este é um dos problemas na sua elaboração, pois a adição de cálcio não é tecnicamente viável devido a facilidade de precipitação com as proteínas (WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994; UMBELINO et al., 2001).

O extrato de soja é adequado para o crescimento de bactérias lácticas devido à presença de oligossacarídeos, aminoácidos e peptídeos. É considerado um excelente veículo para bifidobactérias, já que a proteína da soja protege essas bactérias da ação de sais biliares, favorecendo a colonização intestinal (HAULY; FUCHS; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2005). A mudança em alguns componentes do extrato de soja durante a fermentação com bifidobactérias promove alterações marcantes no teor de proteínas, açúcares, vitaminas do complexo B e ácido láctico e acético, porém com aspectos positivos para seu uso em bebidas fermentadas (HOU; CHOU, 2000).

O crescimento de *B. infantis* e *B. longum* em extrato de soja, e a sobrevivência dessas bifidobactérias em bebida fermentada, com e sem adição de sacarose, durante o período de armazenamento, indicam que esse substrato proporciona o crescimento das bifidobactérias testadas. Também os *Lactobacillus*, assim como outras bactérias ácido-lácticas tem mostrado crescimento satisfatório em extrato de soja (CHOU; HOU, 2000).

CAPÍTULO 2 - FERMENTADO DE SOJA COM POTENCIAL PROBIÓTICO

1 Introdução

É crescente a preocupação com a relação “dieta *versus* saúde”, estimulando as pesquisas que enfocam os alimentos como promotores da saúde e/ou redutores do risco de determinadas doenças, considerados “alimentos funcionais”. Desta maneira, tem-se incentivado a busca de compostos naturais, além do desenvolvimento de ingredientes que possibilitem o surgimento de produtos alimentícios inovadores e novos nichos mercadológicos (PACHECO; SGARBIERI, 1999; RODRÍGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003).

São considerados funcionais aqueles alimentos que “contêm ingredientes ou componentes capazes de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis na manutenção de boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônico-degenerativas, além das suas funções nutricionais básicas” (PUPIN, 2002; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SAAD, 2006). Neste contexto, incluem-se os probióticos que são “microrganismos vivos ou suplementos microbianos, capazes de melhorar o equilíbrio e as funções fisiológicas do trato intestinal humano, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo e aumentando de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, quando administrados em doses adequadas” (BRASIL, 2002; SAAD, 2006).

As evidências científicas relatadas em revisões recentes (PUPIN, 2002; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SAAD, 2006) mencionam que a ingestão de probióticos proporciona a melhoria dos movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes; o equilíbrio da flora intestinal; a prevenção

e/ou controle de infecções intestinais; a modulação do sistema imune; a prevenção de câncer; a redução do colesterol; melhor digestão da lactose; proteção em infecções do trato urinário; prevenção a alergias; redução de inflamações e de hipersensibilidade. Além dos benefícios relativos à nutrição e à saúde, os probióticos podem também contribuir para a qualidade tecnológica do produto, possuindo a vantagem de promover a acidificação, extendendo a vida-de-prateleira. Alguns desses efeitos citados já estão comprovados, outros são hipotéticos, necessitando de maiores estudos, especialmente buscando sua validação com animais e humanos.

De modo geral, os benefícios decorrentes da ingestão de probióticos são observados quando estes são consumidos com frequência, sendo necessária uma concentração mínima de células viáveis de 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitros do produto, obtendo-se assim o efeito dos microrganismos na composição da microbiota intestinal. Considerando-se a necessidade de manter um número elevado de microrganismos viáveis no produto, a ingestão diária mínima recomendada pode ser alcançada pelo consumo de 100 gramas de produto contendo 10^9 UFC (THAMER; PENNA, 2005; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SAAD, 2006).

Dentre os diversos gêneros de microrganismos considerados probióticos destacam-se as bactérias lácticas *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, em especial o *Lactobacillus acidophilus* (LA) (THAMER; PENNA, 2005; SAAD, 2006). O LA linhagem NCFM (LA-NCFM) foi isolado de fezes de lactentes, sendo produzido comercialmente desde 1972, tendo seu genoma recentemente seqüenciado e parcialmente analisado *in silico*. Apresenta características fundamentais para microrganismos probióticos como diversas proteínas de superfície para adesão à mucosa intestinal, produção da bacteriocina Lactacina B (classe II) com atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Clostridium perfringens*. É capaz de usar carboidratos incluindo mono, di e polissacarídeos, além de carboidratos complexos como rafinose e frutooligossacarídeos. Foram identificados *in silico* sistemas de transporte para trealose, frutose, glicose, manose, melobiose, gentiobiose, celobiose, salicina, rafinose e maltose. No entanto, o LA-NCFM, através de análise *in silico* de seu

genoma parece não ter genes envolvidos no aproveitamento de sacarose (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; BARRANGOU et al., 2003, ALTERMANN et al., 2005; TÁRRAGA et al., 2005).

A maioria dos produtos disponíveis no mercado, que apresentam probióticos em sua composição, são alimentos lácteos fermentados, como iogurte, leite acidófilo, *sour cream*, manteiga e leite em pó (PUPIN, 2002). Mesmo assim, em estudo visando quantificar LA e bifidobactérias em produtos com a declaração de sua existência e/ou alegação de funcional, foram detectadas contagens inferiores a 10^5 UFC.g⁻¹ indicando provável perda da viabilidade sem o possível benefício à saúde (BARRETO et al., 2003).

Estudos recentes (CHOU; HOU, 2000; RODRIGUES, 2003; ZHOU, 2004) demonstraram a importância da soja na alimentação pelo valor nutricional e propriedades funcionais, podendo ser usada na forma direta, em associação com outros alimentos da dieta ou como ingrediente principal, justificando o aumento pelo seu interesse e consumo. Evidências científicas (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994; MORAIS; SILVA, 1996; ZHOU, 2004) sugerem efeitos benéficos à saúde associados à ingestão de soja tais como a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas adversos da pós-menopausa, dentre outros.

O extrato de soja, conhecido popularmente como “leite de soja”, é um extrato aquoso obtido a partir de grãos de soja, sendo considerado uma boa fonte alimentar, devido ao seu valor nutricional e funcional. Dentre os principais produtos à base do extrato de soja, seja para consumo direto ou utilizados na elaboração de diversos produtos, estão as bebidas. Entretanto, ainda há problemas na inclusão desses produtos na dieta, devido à presença de oligossacarídeos não-digeríveis, na sua maioria estaquiose e rafinose, que contêm ligações alfa-glicosídicas e beta-frutosídicas. Esses carboidratos não são digeridos no duodeno e alcançam o intestino grosso onde são degradados pelas bactérias intestinais produzindo gás (HOU; YU; CHOU, 2000; RODRIGUES, 2003). O acúmulo anormal de gases flatulentos retais provoca aflição gastrintestinal em indivíduos sensíveis, resultando em dor abdominal, náuseas, diarreia e aumento da peristalse (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994; MORAIS; SILVA, 1996; SILVESTRONI, et al., 2002).

Por outro lado, o extrato de soja, pela presença destes oligossacarídeos com potencial prebiótico, tem sido utilizado como substrato adequado para o crescimento de bactérias ácido-láticas, as quais são amplamente utilizadas na fermentação de iogurtes, queijos e bebidas. A fermentação láctica, pela produção de ácido láctico, acetaldeídos e diacetil, confere características sensoriais agradáveis melhorando o sabor e a aceitabilidade do extrato de soja, além da redução de oligossacarídeos de baixa digestibilidade humana (MORAIS; SILVA, 1996; KAMALY, 1997; GARRO et al., 1999; HOU; YU; CHOU, 2000; HAULY; FUCHS; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2005). Complementarmente, a adição de açúcares (sacarose) pode contribuir para a melhoria do sabor e da viscosidade do produto final. No entanto, a partir dos estudos *in silico* de Altermann et al. (2005), é esperado que o LA-NCFM não utilize a sacarose como fonte de carbono.

Nesse contexto avaliou-se o potencial probiótico de produção do LA-NCFM na elaboração de bebida fermentada de soja, com e sem adição de sacarose.

2 Material e métodos

2.1 Material

Grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] “Embrapa BRS-213” (safra 2004), provenientes da Embrapa Soja, Londrina, PR, foram utilizados. A escolha desta cultivar foi baseada na baixa atividade de lipoxigenases, enzimas responsáveis pelo desenvolvimento de sabor desagradável, o que permite obter derivados de soja com melhor qualidade e aceitabilidade pelo consumidor.

Como probiótico utilizou-se a cultura liofilizada de LA-NCFM (*North Carolina Food Microbiology*), cedida pela Danisco Brasil Ltda., Cotia, SP.

2.2 Métodos

Os grãos de soja foram caracterizados quanto a sua composição centesimal através de análises de umidade; lipídeos; proteínas; cinzas; fibras, conforme metodologias descritas na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2003).

Os carboidratos foram determinados por diferença (carboidratos = 100 – umidade – proteínas -lipídeos – cinzas – fibras).

O extrato aquoso foi elaborado a partir de grãos de soja macerados em água, por duas horas, à temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, em equipamento extrator SOJAMAC[®] MJ720 (FIZA, São Paulo, SP). A proporção soja: água foi calculada para obtenção de extrato com 2% (p/p) de proteínas, conforme Rodrigues (2003). Esse extrato foi dividido em dois lotes, num dos quais se adicionou açúcar na concentração de 5% (p/p).

Para a produção de derivado lácteo utilizou-se leite bovino UHT semi-desnatado contendo 1,5% de gordura, adquirido no comércio local, o qual foi fermentado nas mesmas condições do extrato de soja, constituindo-se referência ao estudo.

O extrato de soja e o leite foram previamente esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121°C e 110°C , respectivamente, e após resfriados a 37°C para adição do inóculo.

O LA-NCFM foi reativado em leite desnatado reconstituído com 11% (m/v) de sólidos (Molico[®], Nestlé, Araçatuba, SP), adicionado de 0,5% (m/v) de extrato de levedura comercial, previamente esterilizado a 115°C por 10min. O cultivo foi mantido a 37°C por 12 horas. Em seguida, reativou-se o cultivo no leite por mais duas vezes, sendo transferido para o extrato de soja estéril ($121^{\circ}\text{C}.15\text{min}^{-1}$) e cultivado desta maneira por três vezes, gerando o inóculo de trabalho, conforme citado por Wang, Marinho e Carvalho (1994).

Os extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), bem como o leite, foram adicionados com 2% (v/v) de inóculo para fermentação, mantidos a 37°C , até atingirem pH de aproximadamente 4,5. Atingido esse parâmetro, o que ocorreu após 12 horas de fermentação, o produto foi armazenado a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Durante o processo fermentativo nos extratos E0% e E5%, e no leite, foram monitorados o pH, o teor de sólidos solúveis, a acidez titulável, a densidade e a viscosidade aparente, em intervalos de duas horas. O número de células viáveis foi

avaliado nos extratos E0%, em intervalos de duas horas, e no extrato E5% no início, após duas horas e final do processo fermentativo. O extrato fermentado sem adição de açúcar (E0%) foi armazenado por 28 dias a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$; após este período avaliou-se o pH, sólidos solúveis totais, acidez total e número de células viáveis.

A elaboração da bebida fermentada probiótica seguiu o fluxograma apresentado na Figura 2.1.

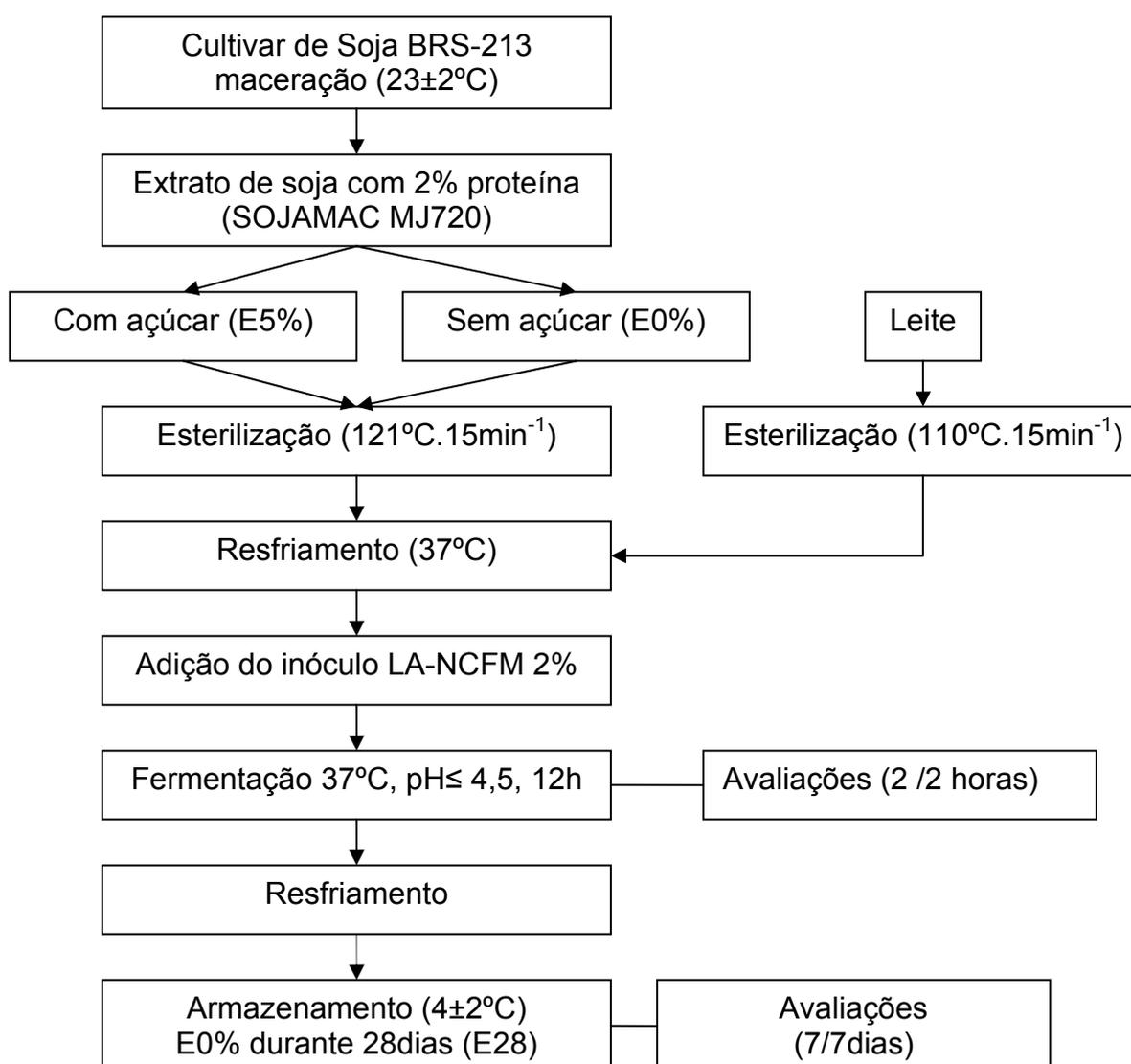


Figura 2.1. Fluxograma de elaboração da bebida de soja fermentada probiótica e de leite fermentado.

O pH foi determinado com potenciômetro digital (pHmeter Digimed DM-20); os sólidos solúveis foram determinados com refratômetro manual (ATAGO N-1E) e expressos em graus Brix; a acidez titulável foi determinada por titulação com solução

de NaOH 0,1N (AOAC nº. 947.05) e expressa em porcentagem de ácido láctico; a densidade foi determinada pela relação massa/volume e expressa em gramas por mililitros; a viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro (Viscotester 6L, ThermoHaake), à velocidade de 100rpm, por 30 segundos, e os resultados expressos em miliPascal (mPa). A viabilidade celular foi determinada pela técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS - Oxoid). As placas, em duplicata, foram incubadas a 37°C, durante 72 horas, em jarras herméticas com emprego de geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac). As colônias foram contadas e o resultado expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro ($\log\text{UFC.mL}^{-1}$).

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado, com a realização de três repetições para cada tratamento. As variáveis foram avaliadas em triplicata para cada repetição, exceto a contagem de células viáveis que foi realizada em duplicata. Esses dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey 5%, para comparação de médias.

3 Resultados e discussão

Os grãos da cultivar BRS-213 apresentaram a seguinte composição centesimal média: umidade 5,11%; lipídeos, 20,02%; proteínas, 35,57%; cinzas, 5,51%; fibras, 5,13% e carboidratos (por diferença) 28,66%.

Após doze horas de fermentação dos extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), os valores de pH foram de 4,50 e 4,23; respectivamente, não havendo diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os mesmos (Figura 2.2 e Tabela 2.1).

O monitoramento do pH é considerado um dos critérios mais eficientes para o acompanhamento do processo fermentativo de produtos probióticos, citando-se que valores finais entre 4,0 e 4,5 são considerados adequados (WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994; OLIVEIRA et al., 2001). Isso indica que a fermentação conduzida ocorreu normalmente atingindo o pH final esperado. No mesmo período, o fermentado com leite apresentou o pH 5,60, caracterizando um processo de

fermentação ainda incompleto, comparado aos parâmetros preconizados neste estudo.

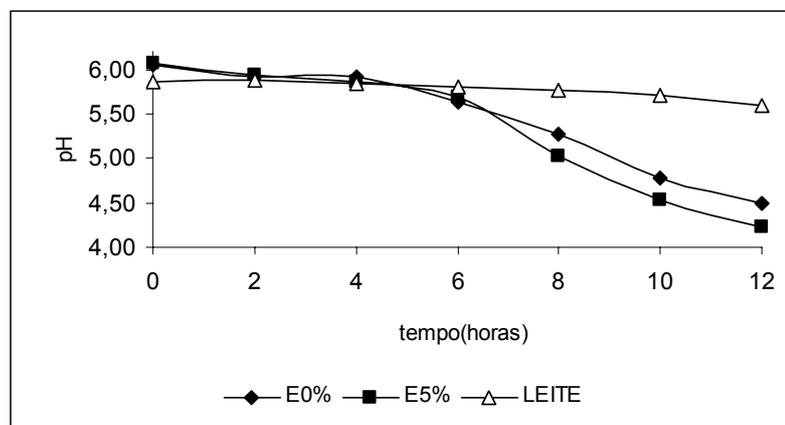


Figura 2.2. Valores de pH durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.

Estudo precedente (CUENCA; QUICAZÁN, 2004) verificou comportamento semelhante do pH na fermentação de extrato de soja. Porém, naquele estudo o tempo necessário para que o pH atingisse valores de 4,5 foi menor, entre 7 e 8 horas de incubação. Esse resultado pode ser atribuído ao emprego de culturas associadas como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus lactis* que potencializam a fermentação. Já, Wang, Marinho e Carvalho (1994) na elaboração de iogurte de soja com cultura mista de *Lactobacillus acidophilus* + *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus bulgaricus* relatam decréscimo no pH, a partir de 4 horas do início do processo fermentativo, atingindo valores próximos a 4,5 ao final de doze horas, confirmando a tendência observada neste trabalho.

À semelhança do que ocorreu com o pH (Figura 2.2), até 4 horas de fermentação, a acidez praticamente não alterou (Figura 2.3). Segundo vários autores (WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994; QUICAZÁN; SANDOVAL; PADILLA, 2001; CUENCA; QUICAZÁN, 2004) esse comportamento é normal e corresponde à fase de latência da curva de crescimento do probiótico, quando ainda não há marcante crescimento ou atividade microbiana.

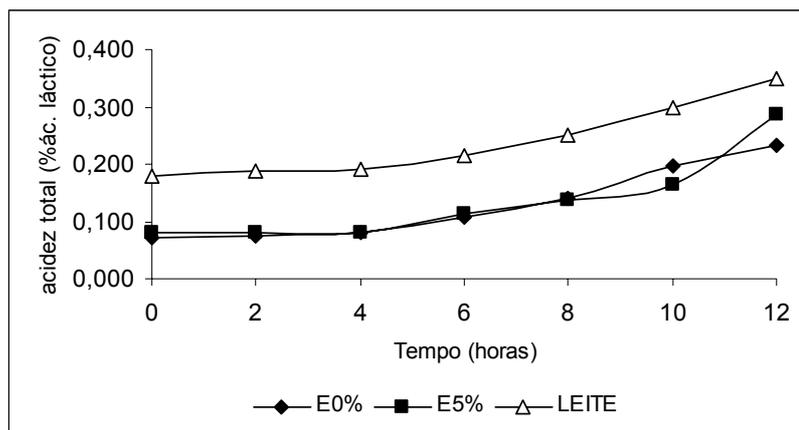


Figura 2.3. Acidez total (% em ácido láctico) durante a fermentação por LA-NCF de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.

A partir da 4ª hora a acidez titulável dos extratos de soja aumentou de 0,071% e 0,080% de ácido láctico no início do processo, para 0,232% e 0,286%, após 12 horas de fermentação, nas bebidas fermentadas E0% e E5%, respectivamente. Estes valores não diferiram significativamente entre os tratamentos em cada período de avaliação. Valores semelhantes, que variaram de 0,25 a 0,30% de acidez (em ácido láctico) foram mencionados em outros estudos (HOU; YU; CHOU, 2000; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; CUENCA; QUICAZÁN, 2004). A redução de pH (Figura 2.2) é coerente com o aumento da acidez observada no mesmo período (Figura 2.3).

A produção de ácido é citada como um dos fatores importantes para a aceitabilidade de produtos fermentados, destacando-se o ácido láctico como componente majoritário, sendo a forma L(+) a mais produzida (66%) por LA-NCFM (ALTERMANN et al., 2005). Os resultados mostraram que o probiótico em estudo é capaz de fermentar o extrato em 12 horas de incubação, a 37°C, provavelmente utilizando os oligossacarídeos presentes naturalmente na soja, sem a necessidade de adição de sacarose ou de outras culturas consideradas “*starter*” em processos fermentativos (Figuras 2.2 e 2.3, Tabela 2.1). Essa afirmativa é feita com base no fato de que a adição de açúcar não interferiu na velocidade da fermentação, nem na queda do pH, nem na elevação da acidez.

Além disso, o teor de sólidos solúveis evidenciou que o açúcar adicionado (5%) no extrato de soja, manteve-se nessa proporção no final do processo

fermentativo (Figura 2.4). Isso pode ser explicado a partir de estudos de Altermann et al. (2005), os quais verificaram ser o LA-NCFM capaz de utilizar vários oligossacarídeos, mas não foi evidenciado gene ou operon codificados por enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose. Destaca-se, no entanto, que os estudos de Altermann et al. (2005) foram realizados *in silico*.

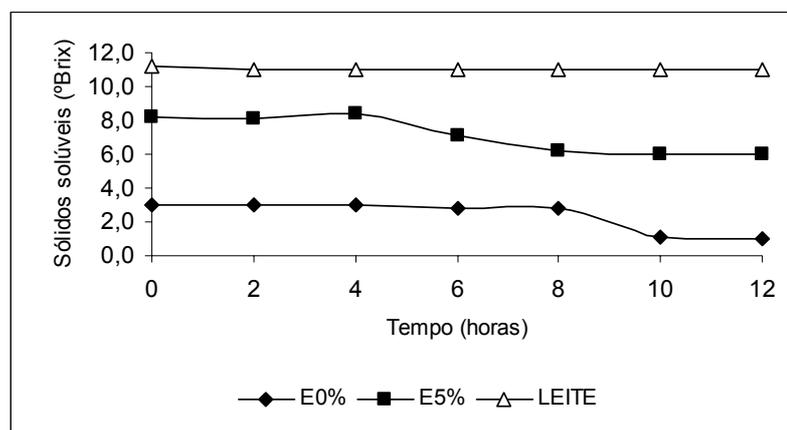


Figura 2.4. Teor de sólidos solúveis (°Brix) durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.

Segundo Quicazán, Sandoval e Padilla (2001) o teor de sólidos do extrato de soja tem efeito sobre as características físico-químicas e sensoriais da bebida fermentada. Segundo esses autores bebidas mais diluídas, que apresentam teor de sólidos solúveis inferior a 6,5°Brix alcançam valores de acidez menores, baixa viscosidade, coágulo sem firmeza e alta sinerese. O resultado obtido no teor de sólidos solúveis é concordante com essa afirmativa quanto à viscosidade aparente (Figura 2.6). Embora não interfira na fermentação, a adição de açúcar é recomendável do ponto de vista sensorial e tecnológico, resultando em produtos mais viscosos e saborosos. O aspecto sensorial, segundo Borrmann et al. (2006), é tão importante quanto o potencial probiótico quando se pensa na formulação de um novo produto.

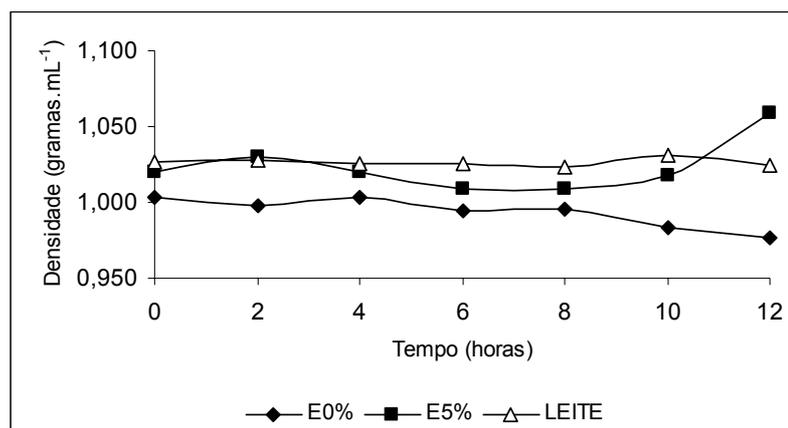


Figura 2.5. Densidade (g.mL^{-1}) durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.

Estudos de Reddy e Mital (1992) utilizando extrato de soja elaborado com diferentes cultivares de soja obtiveram valores semelhantes de densidade com variações de 1,008 a 1,028. Esses valores concordam com os observados neste estudo para o início da fermentação, ou seja, 1,004 e 1,020, no extrato E0% e E5%, respectivamente. Ao final do processo fermentativo obteve-se para E0% e E5% os valores de densidade de 0,973 e 1,059 (Figura 2.5), os quais diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$), e são coerentes com estudos anteriores de Cuenca e Quicazán (2004). Também, em estudos preditivos de Altermann et al. (2005) e Barrangou et al. (2003) foi verificado que linhagens de LA-NCFM são capazes de produzir biopolímeros a partir de oligossacarídeos. Esses biopolímeros podem, em presença de água, ácidos, açúcares e variações de temperatura, alterar propriedades reológicas do meio, o que pode explicar, ao menos em parte, o incremento da viscosidade aparente.

A viscosidade aparente incrementou marcadamente nos extratos de soja, sem (E0%) ou com (E5%) a adição de açúcar, a partir da 8ª hora de fermentação (Figura 2.6).

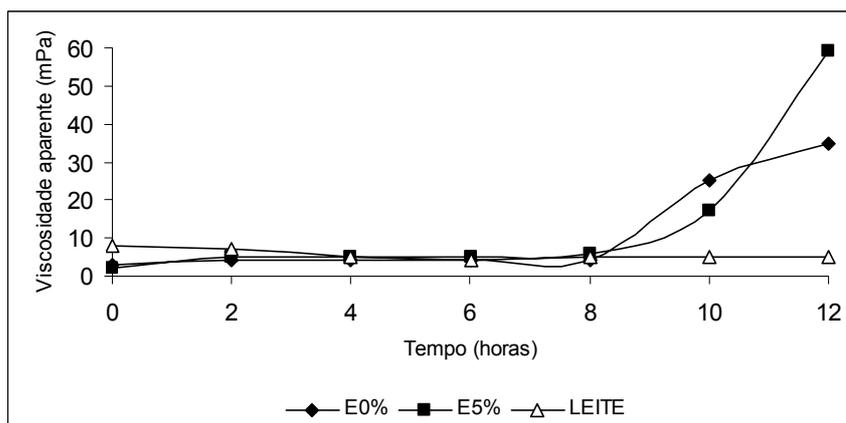


Figura 2.6. Viscosidade aparente (mPa) durante a fermentação por LA-NCFM de extratos de soja, sem (E0%) e com adição de açúcar (E5%), e leite.

Ao final do processo fermentativo (12 horas), quando o pH situava-se entre 4,5 e 4,23, a viscosidade atingiu 35mPa e 59mPa, respectivamente, para E0% e E5%. Comparando-se as variações da viscosidade aparente com as de pH, acidez e sólidos solúveis (SS), observa-se tendência à redução dos SS e do pH, com o conseqüente aumento da acidez, a partir da 4ª hora de fermentação, resultando no aumento da viscosidade, a partir da 8ª hora. As diferenças de viscosidade aparente, no final do processo, podem ser atribuídas à presença de sacarose com a conseqüente maior concentração de sólidos solúveis no produto.

Valores semelhantes de viscosidade aparente inicial, com variação de 4,5 a 5,0 mPa, foram observados em estudo anterior de caracterização físico-química de extratos de soja elaborados com diferentes cultivares (REDDY; MITAL, 1992). No que concerne aos valores finais de viscosidade aparente pode-se verificar que os obtidos neste estudo são concordantes com os já mencionados por outros autores. Cuenca e Quicazán (2004) elaboraram bebida de soja fermentada na qual verificaram aumento pronunciado na viscosidade aparente, a partir de quatro horas de fermentação, mantendo-se estável a partir daí, com valores semelhantes variando de 8mPa para 70mPa. Esse maior incremento na viscosidade aparente, comparado ao obtido neste estudo, pode estar relacionado ao uso de culturas mistas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus lactis*) e a valores superiores de sacarose (8%), teor de sólidos (8ºBrix) e temperatura de incubação (42°C) utilizados naquele estudo.

O comportamento de LA-NCFM em extrato sem açúcar (E0%) apresentou-se dentro dos parâmetros normais de crescimento para bactérias ácido lácticas, atingindo um número de células viáveis satisfatório ($9,98\log\text{UFC.mL}^{-1}$) ao término da fermentação (Figura 2.7).

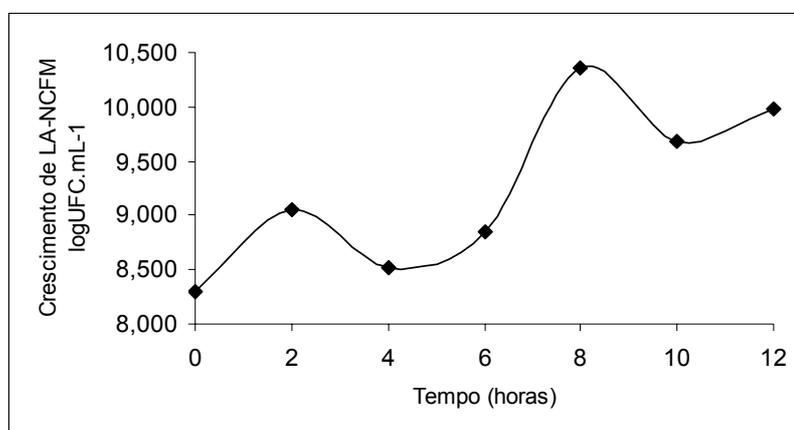


Figura 2.7. Crescimento de LA-NCFM em extrato de soja sem açúcar (E0%) durante a fermentação.

O leite utilizado como parâmetro do processo fermentativo não apresentou a fermentação completa neste mesmo período, sem alcançar o $\text{pH} \leq 4,5$ preconizado no início do experimento, apesar de produzir maior quantidade de ácido láctico (0,348%) em comparação com o extrato (Tabela 2.1).

A contagem de células viáveis de LA-NCFM foi, em média, de $9,97\log\text{UFC.mL}^{-1}$ ao final da fermentação (12 horas) para E0% e E5%, não tendo havido diferença quanto a adição de açúcar (Tabela 2.1). Estudos ressaltam que elevadas contagens microbianas podem garantir a manutenção do nível mínimo no potencial probiótico durante o armazenamento e consumo, atendendo aos parâmetros da legislação (BARRETO et al., 2003; OLIVEIRA, DAMIN, 2003).

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2002) o produto alimentício para ser considerado probiótico deve conter concentrações de 10^6UFC.mL^{-1} viáveis quando da aquisição do mesmo, tal valor equivale a $6,0\log\text{UFC.mL}^{-1}$, validando como probióticos os produtos obtidos neste estudo.

Em estudos precedentes de Wang e Ascheri (1991), também trabalhando com extratos de soja fermentados por *L. acidophilus*, obtiveram valores de

8,0logUFC.mL⁻¹, em processo fermentativo com duração de 16 a 20 horas. Os autores relatam que a adição de açúcares complementares, como glicose e sacarose, estimulam o incremento do número de células. Tal comportamento não foi reproduzido neste trabalho, provavelmente em função da diferença de linhagem utilizada, da quantidade de inóculo, e do tempo de fermentação utilizados neste estudo. No trabalho de Wang e Ascheri (1991) não há detalhamento da linhagem utilizada. O presente estudo empregou o probiótico LA-NCFM que é capaz de utilizar uma variedade de carboidratos, incluindo mono, di e polissacarídeos, além de carboidratos complexos como rafinose e frutooligossacarídeos (ALTERMANN et al., 2005).

Haully, Fuchs e Prudêncio-Ferreira (2005) obtiveram características semelhantes às caracterizadas neste estudo de pH e acidez bem como de viabilidade celular de 9,48logUFC.mL⁻¹, em iogurte de soja, obtido pela fermentação com *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*.

Tabela 2.1. Valores médios de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, densidade, viscosidade aparente e número de células viáveis em leite e em extrato de soja sem (E0%) e com a adição de sacarose (E5%), ao final da fermentação e após 28 dias (E28) a 4±2°C

Determinação*	Leite	E0%	E5%	E28
pH	5,60	4,50a	4,23a	4,64a
Sólidos solúveis (°Brix)	11,0	1,0b	6,0a	1,5b
Acidez total (% em ácido láctico)	0,348	0,232b	0,286b	0,415a
Densidade (g.mL ⁻¹)	1,024	0,973b	1,059a	nd
Viscosidade aparente (mPa)	5	35b	59a	nd
LA-NCFM (log UFC. mL ⁻¹)**	nd	9,98a	9,95a	8,15b

Médias com letras distintas, na mesma linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey (p≤0,05)

* Valores correspondentes à média de três repetições

** Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias de LA-NCFM por mL de extrato de soja, média de duas repetições.

nd = não determinado.

A viabilidade do LA-NCFM no extrato fermentado E0%, avaliada após 28 dias a 4±2°C (Tabela 2.1), manteve elevado número de bactérias lácticas viáveis, (8,15log.UFC.mL⁻¹). Apesar da redução em relação a contagem ao final da

fermentação ($9,98 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) o valor é superior aos valores mínimos necessários para a caracterização da bebida como probiótica, obtido após 28 dias a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Alguns fatores do extrato como acidez, ácidos produzidos durante o armazenamento, presença de oxigênio, produção de compostos antimicrobianos e redução de nutrientes no substrato, são citados como responsáveis pela redução da viabilidade e, conseqüentemente, das propriedades probióticas do produto (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; PUPIN, 2002). O produto elaborado neste estudo manteve elevada contagem, até 28 dias de armazenamento, indicando excelente viabilidade como probiótico, além de propiciar condições de vida-de-prateleira similares aos produtos existentes no mercado.

Ao compararem-se as características dos produtos E0% e E5% ao final do processo, após 12 horas de fermentação a 37°C , verificou-se que a adição de sacarose não afetou o pH, a acidez total nem o número de células viáveis. Isso indica que a sacarose não é necessária do ponto de vista do processo fermentativo.

O pH inicial do extrato que era de 6,07 a 6,05 reduziu para 4,50 e 4,23 nos extratos E0% e E5%, respectivamente. Quanto à produção de ácido láctico, houve incremento em relação aos valores iniciais de E0% e E5% de 0,071 e 0,080, respectivamente, em cerca de 227% e 257%. Apesar disto, a adição de sacarose antes da fermentação, não influenciou a velocidade do processo fermentativo nem o crescimento de LA-NCFM como pode ser evidenciado pelos valores de 9,98 e $9,95 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ relativos ao número de células viáveis de E0% e E5%, respectivamente. Esses resultados sugerem que o LA-NCFM tem preferência pelos oligossacarídeos naturalmente presentes na soja, como rafinose e estaquiose, conforme predito *in silico* (ALTERMANN et al., 2005), em detrimento da sacarose ou da lactose. Os resultados obtidos evidenciam a possibilidade de fermentação do extrato de soja por cultura isolada de LA-NCFM, sem necessidade de acréscimo de sacarose, sendo um dado relevante e inovador no desenvolvimento de produtos probióticos.

As pesquisas futuras estão sendo direcionadas para o estudo da aceitabilidade, bem como das respostas biológicas destes produtos, no que

concerne a viabilidade e prevalência de células, e seus benefícios no metabolismo animal, visando sua funcionalidade probiótica em humanos.

4 Conclusão

O *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM apresenta potencial fermentativo em extrato de soja, não havendo necessidade da adição de sacarose para a obtenção de valores adequados de pH (próximo a 4,5), acidez, viscosidade aparente e número de células viáveis. O produto mantém prevalência de células viáveis, com índices acima do preconizado pela legislação vigente, durante os 28 dias de armazenamento a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO SENSORIAL DE BEBIDA DE SOJA FERMENTADA PROBIÓTICO

1 Introdução

É crescente a busca por alimentos saudáveis, com destaque aos que possuem propriedades funcionais, como é o caso da soja. Prova disso, é a crescente inovação e oferta de produtos à base de soja similares aos derivados lácteos (iogurtes, bebidas, gelados comestíveis, sorvetes, etc.), aos derivados de carne (embutidos, quibe, salsichas vegetais, etc.), aos produtos de panificação (farinhas, pães, biscoitos, etc.), entre outros. O impacto econômico é significativo, estimando-se que o setor de alimentos derivados de soja no Brasil deve atingir um faturamento anual de R\$ 4 bilhões até 2020 (GUIMARÃES, 2005; PARRA, 2007).

As tendências globais apontando a saúde e o bem-estar como preocupações dos indivíduos têm direcionado os investimentos industriais em alimentos para esses segmentos. São constantes as inovações nesse setor com lançamentos de bebidas, principalmente com soja, que no Brasil têm crescido numa média de 30% ao ano. Da mesma forma, o mercado de probióticos tem apresentado um incremento expressivo. Como exemplo, é crescente o mercado de iogurtes funcionais que movimentou no período de novembro/05 a setembro/06, a quantia de 291 milhões de reais, apresentando um acréscimo de 55% (PARRA, 2007).

Estudo sobre a informação nutricional e atitude do consumidor em relação a produtos saudáveis demonstrou que os consumidores estão descobrindo e valorizando mais os alimentos diferenciados. Na América Latina, 36% das pessoas entrevistadas afirmaram que consomem “às vezes” bebidas fermentadas contendo

bactérias consideradas benéficas, enquanto que no Brasil 27% mencionaram um consumo regular desses produtos. O extrato de soja foi apontado como consumido regularmente por 13% e 20% dos entrevistados na América Latina e no Brasil, respectivamente (ACNIELSEN, 2005).

O extrato de soja pode ser consumido na forma direta ou como componente na elaboração de diversos produtos. Embora sejam conhecidos os potenciais efeitos benéficos do consumo de extrato ou produtos à base de extrato de soja, o consumo é ainda limitado devido a características sensoriais indesejáveis como o “sabor a feijão”, adstringência e à presença de oligossacarídeos causadores de flatulência, presentes na maioria das variedades de soja (MORAIS; SILVA, 1996; FAVARO TRINDADE et al., 2001; TASHIMA; CARDELLO, 2003).

Em função do bom equilíbrio nutricional do extrato de soja, há potencial para sua utilização como meio de crescimento para bactérias ácido-láticas, amplamente utilizadas na obtenção de produtos fermentados, como iogurtes, queijos e bebidas lácteas. Vários estudos mencionam que a fermentação ácido-láctica pode melhorar o sabor e reduzir compostos considerados como fatores antinutricionais, como o ácido fítico. De modo geral, o processo fermentativo melhora os atributos sensoriais dos produtos de soja, além de diminuir e/ou mascarar a percepção dos compostos que conferem estas características indesejáveis como a adstringência e o “sabor de feijão ou soja” (WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994; MORAIS; SILVA, 1996; GARRO et al., 1999; GOMES; MALCATA, 1999a; FAVARO TRINDADE et al., 2001; HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005).

A associação de bactérias ácido-láticas com características probióticas em alimentos fermentados é cada vez mais desejável, tendo em vista os potenciais efeitos benéficos à saúde e considerando-se a familiaridade cada vez mais crescente do consumidor com o fato de que estes alimentos contêm microrganismos vivos (GOMES; MALCATA, 1999a; HELLER, 2001).

Os desafios no preparo de uma bebida probiótica fermentada à base de soja estão baseados em três aspectos principais: 1) a capacidade das bactérias crescerem e atingirem população mínima compatível com produto probiótico; 2)

manter a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento refrigerado do produto, bem como haver prevalência no trato digestivo do consumidor; e, 3) ser um produto com boa aceitabilidade sensorial.

Os dois primeiros desafios já foram superados e, nesta fase, será tratada a qualidade sensorial do produto, que segundo Borrmann et al., (2006) é decisiva na escolha de bebidas de soja pelo consumidor, principalmente o atributo sabor, sobrepondo-se inclusive às alegações funcionais.

Com este trabalho, realizado em duas fases, objetivou-se avaliar sensorialmente a bebida de soja fermentada probiótica, identificando a aceitação e preferência do consumidor.

2 Material e métodos

2.1 Material

Foram utilizados grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merril], “Embrapa BRS-213” (safra 2004), provenientes da Embrapa Soja, Londrina, PR. Esta cultivar é própria para consumo humano pelo sabor suave e baixa atividade de lipoxigenases. Como probiótico utilizou-se a cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM (*North Carolina Food Microbiology*), gentilmente cedida pela Danisco Brasil Ltda., Cotia, SP. O açúcar (sacarose comercial) foi adquirido no comércio local.

2.2 Experimento e tratamentos

O experimento foi conduzido em duas fases. Inicialmente avaliaram-se as características sensoriais do extrato e da bebida fermentada probiótica quanto aos atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. Os resultados serviram de base à elaboração da bebida com características mais próximas do desejável pelos consumidores, ordenadas de acordo com a preferência.

Na primeira fase, em experimento inteiramente ao acaso, foram avaliados três tratamentos: bebida fermentada e adicionada de 5% açúcar (p/p) (BFP5%),

bebida fermentada sem adição de açúcar (BFP0%) e extrato de soja não fermentado (ENF).

Na segunda fase, em experimento inteiramente ao acaso, foram avaliados os tratamentos: bebida fermentada adicionada de açúcar (p/p) nas concentrações de 8% (BFP8%), 10% (BFP10%) e 12% (BFP12%).

2.3 Elaboração do extrato de soja e da bebida fermentada probiótica

A elaboração do extrato de soja, com 2% de proteína, seguiu o procedimento mencionado anteriormente (Capítulo 2, item 2.2), sendo modificada a preparação do inóculo.

O *Lactobacillus acidophilus*-NCFM (LA-NCFM) foi reativado em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe) pH 6,0 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e mantido a 37°C por 16 horas, gerando assim o inóculo de trabalho. O extrato de soja estéril foi adicionado de inóculo na concentração de 2% (v/v) para fermentação e mantido a 37°C até atingir pH próximo a 4,5 conforme recomendado por Wang, Marinho e Carvalho (1994). A preparação do inóculo e a manipulação para ativação e propagação do microrganismo foram realizadas em câmara de fluxo laminar. Ao término da fermentação o produto foi armazenado a 4±2°C, para posterior análise sensorial.

Durante o processo fermentativo foram monitorados, na primeira fase do experimento, o pH, o teor de sólidos solúveis, a acidez titulável, a densidade e a viscosidade aparente em intervalos de duas horas até o final do processo fermentativo. No início e término do processo fermentativo determinou-se o número de células viáveis de LA-NCFM na bebida. Na segunda fase do experimento foram monitorados o pH, o teor de sólidos solúveis e a acidez titulável, em intervalos de duas horas até o final do processo fermentativo.

O pH foi determinado com potenciômetro digital (pHmeter Digimed DM-20); os sólidos solúveis foram determinados com refratômetro manual (ATAGO N-1E) e expressos em graus Brix; a acidez titulável foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1N (AOAC nº 947.05) e expressa em porcentagem de ácido láctico; a

densidade foi determinada pela relação massa/volume e expressa em gramas por mililitro; a viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro (Viscotester 6L, ThermoHaake), à velocidade de 100rpm, por 30 segundos, e os resultados expressos em miliPascal (mPa).

A determinação de células viáveis foi realizada pela técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se ágar MRS. As placas, em duplicata, foram incubadas a 37°C, durante 72 horas, em jarras herméticas com emprego de geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac, São Paulo, SP). As colônias foram contadas e o resultado expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro ($\log\text{UFC.mL}^{-1}$).

2.4 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial da bebida de soja fermentada probiótica, foi realizada com amostras codificadas com três dígitos aleatórios servidas em porções de 15mL, refrigeradas a $10\pm 2^\circ\text{C}$, em copos plásticos descartáveis com capacidade unitária de 50mL. Os testes foram realizados em cabines individuais do Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Participaram da análise sensorial provadores não treinados, de ambos os sexos, potenciais consumidores do produto, sendo esses professores, alunos e funcionários pertencentes à comunidade acadêmica da UFPel.

Os provadores receberam as amostras, apresentadas de forma monádica seqüencial, e ficha de avaliação das mesmas, sendo instruídos a enxaguar a boca com água potável, em temperatura ambiente, entre a avaliação de cada amostra.

2.4.1 Primeira fase: teste de aceitação – escala hedônica

Na primeira fase foram avaliadas sensorialmente amostras de bebida de soja fermentada probiótica elaborada com 5% de açúcar (BFP5%), bebida de soja fermentada probiótica sem adição de açúcar (BFP0%) e extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF).

A aceitação foi avaliada por 46 provadores com idade entre 18 e 44 anos. Os atributos aparência, aroma, textura, sabor e impressão global foram avaliados através de escala hedônica estruturada mista de 9 pontos, onde os extremos se ancoraram nos termos “9 - gostei muitíssimo” e “1 - desgostei muitíssimo”. Nesta escala, as notas entre 7 e 9 (gostei regularmente e gostei muitíssimo) sugerem que o produto poderá ser aceito no mercado consumidor sob o ponto de vista sensorial (MEILGAARD, CIVILLE; CARR, 1991; MORAES, 1993; STONE; SIDEL, 1993; ANZALDUA-MORALES; 1994).

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Statistica, versão 6.0 (STATISTICA, 2001) aplicando-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (significância de 5%) para a comparação das médias dos resultados das amostras.

2.4.2 Segunda fase: teste de preferência - ordenação

Na segunda fase avaliou-se a preferência, através de teste de ordenação, de bebida de soja probiótica fermentada elaborada com concentrações de açúcar de 8, 10 e 12% codificadas como BFP8%, BFP10% e BFP12%, respectivamente.

Participaram do teste 87 provadores, com idade entre 17 e 60 anos, os quais responderam a questões quanto à faixa etária, sexo, frequência de consumo e tipo de produto de soja consumido (Figura 3.1). Os provadores foram orientados a ordenar as amostras, de acordo com a doçura, de forma crescente, atribuindo valores de 1 a 3, sendo a amostra de pior doçura ordenada em primeiro lugar e a considerada de melhor doçura em terceiro lugar (CHAVES, 1993; MORAES, 1993).

Os resultados foram analisados após a transformação dos dados de acordo com a tabela de Fischer (MORAES, 1993; ANZALDUA-MORALES; 1994). Realizou-se análise de variância (ANOVA) dos dados transformados e comparação de médias dos resultados pelo teste de Tukey (significância de 5%).

Nome: _____ Idade: _____

Instruções: Estas recebendo amostras de bebida de soja. Ordena-as, em ordem crescente, de acordo com a sua preferência em relação ao grau de doçura.

Código da amostra	Ordenação
962	_____
521	_____
487	_____

Comentário adicional: _____

Responda agora, quais produtos de soja consomes.

Qual é a frequência de consumo de produtos de soja:

() consumo frequentemente (ate 3 vezes por semana)

() consumo ocasionalmente (ate 3 vezes por mês)

() nunca consumo

Figura 3.1. Ficha de avaliação sensorial utilizada no teste de preferência de bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com a adição de açúcar (BFP5%), e extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF)

2.5 Avaliação físico-química

Ao final da segunda fase foi avaliada a composição físico-química do extrato de soja e da bebida de soja fermentada probiótica com 12% de açúcar, através de determinações de proteínas, lipídeos, cinzas, fibra bruta, açúcares redutores, carboidratos, sólidos totais, sólidos solúveis, pH e acidez (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985; AOAC, 2003). Também foram determinadas as concentrações de isoflavonas segundo a metodologia descrita por Genovese e Lajolo (2001), as análises foram realizadas no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP.

3 Resultados e discussão

3.1 Aceitação de bebida de soja fermentada probiótica

Na tabela 3.1 estão as principais características físico-químicas e contagem de células das bebidas utilizadas na análise sensorial de aceitação.

Tabela 3.1. Valores médios de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, densidade, viscosidade aparente e número de células viáveis em bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com a adição de açúcar (BFP5%), e em extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF)

Determinação*	BFP0%	BFP5%	ENF
pH	4,46	4,55	6,05
Sólidos solúveis (°Brix)	1,0	6,0	3,0
Acidez (% em ácido láctico)	0,232	0,348	0,071
Densidade (g.mL ⁻¹)	0,973	1,059	1,004
Viscosidade aparente (mPa)	35,0	59,0	3,0
LA-NCFM (logUFC. mL ⁻¹)**	9,98	9,95	nd

* Valores correspondentes à média de três repetições

** Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus acidophilus*-NCFM por mL de amostra, média de duas repetições.

nd = não determinado.

Ao analisar-se os dados da Tabela 3.1 verificou-se que a fermentação ocorreu adequadamente, tendo em vista que após 12 horas a 37°C atingiu-se o pH recomendável para esse tipo de produto, ou seja, aproximadamente 4,5. Ficou evidenciado que o açúcar adicionado não interferiu no processo fermentativo, provavelmente não tendo sido metabolizado pelo microrganismo probiótico, já que a diferença de sólidos solúveis totais entre as bebidas corresponde ao açúcar adicionado. Outro aspecto importante é o fato de que as contagens de células viáveis apresentaram valores acima de 10⁶UFC.mL⁻¹, um dos requisitos para produto probiótico (BRASIL, 2002).

A bebida BFP5% apresentou maior viscosidade, provavelmente associada ao maior teor de sólidos solúveis, que em meio ácido e presença de oligossacarídeos pode contribuir para a formação de géis. Almeida e Pastore (2001) mencionam que os oligossacarídeos, quando comparados aos mono e dissacarídeos, promovem elevação da viscosidade, aumentando o “corpo” e a sensação de viscosidade do alimento na boca, devido ao maior peso molecular.

Haully, Fuchs e Prudêncio-Ferreira (2005) relatam a importância da viscosidade para a aceitação de bebidas, salientam que a mesma está diretamente relacionada ao processo, tipo de substrato, tratamento térmico, condições de incubação e resfriamento, além do tipo de cultura láctica.

Tabela 3.2. Aceitação de bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com adição de açúcar (BFP5%), e de extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF)

Atributo	BFP0%	BFP5%	ENF
Aparência	5,65±1,68c	5,13±1,85b	6,00±2,16a
Aroma	4,33±1,65b	4,72±1,63a	4,95±1,55a
Textura	4,98±1,84b	5,37±1,91a	5,26±1,63a
Sabor	2,69±1,44c	5,22±2,05a	3,95±1,78b
Impressão Global	4,00±1,79c	5,15±2,11a	4,80±1,73b

*valor correspondente a média das notas atribuídas por 46 provadores.

Médias nas linhas, seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 3.2, verifica-se que pela análise sensorial global, o melhor desempenho foi da amostra BFP5%, destacando-se também pelo bom sabor, textura e aroma. No que concerne à aparência, destaca-se o extrato não fermentado o que pode ser relacionado à menor viscosidade e a maior fluidez, bem como uma coloração mais clara. Também pode estar associada ao aspecto de “arenosidade” e “granulosidade” mencionado por alguns provadores que detectaram esse problema nas bebidas BFP0% e BFP5%.

Os escores dos atributos aparência e aroma, apesar de superiores para o extrato não fermentado, equivalentes a 6,0 e 4,95, respectivamente na escala hedônica correspondem a “gostei ligeiramente” e “desgostei ligeiramente”. Estes valores indicam que o produto necessita de modificações na sua formulação ou processamento para que seja aceito no mercado consumidor sob o ponto de vista sensorial (MORAES, 1993; STONE; SIDEL, 1993).

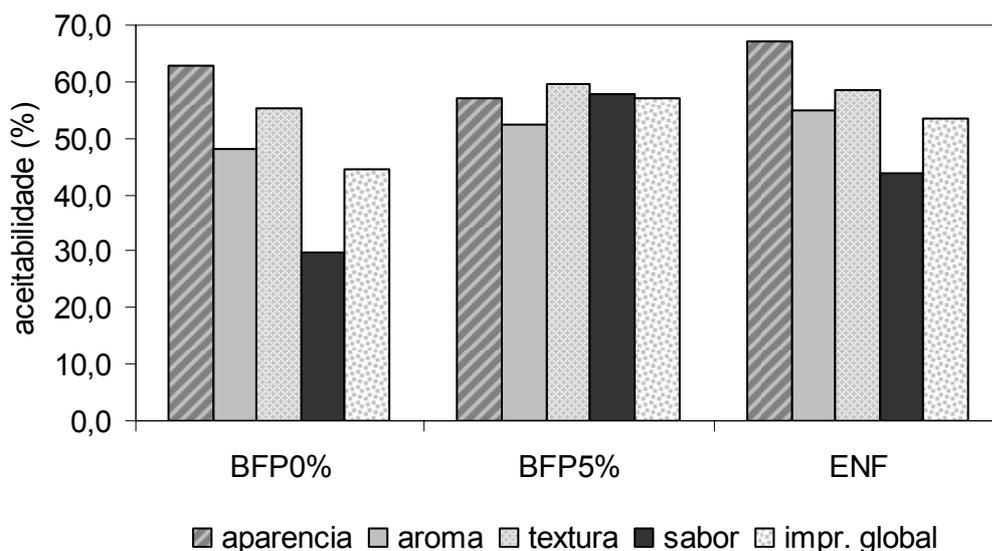


Figura 3.2. Índice de aceitabilidade de bebida de soja fermentada probiótica sem (BFP0%) e com a adição de açúcar (BFP5%), e extrato de soja não fermentado e sem açúcar (ENF), para os atributos aparência, aroma, textura, sabor e impressão global

No geral, a bebida adicionada de sacarose (BFP5%) apresentou melhor aceitabilidade nos atributos sabor, impressão global, aroma e textura, sendo superior às demais em relação aos dois primeiros, porém não apresentou diferença quanto aos dois últimos comparando-se com o ENF. Evidencia-se com isso uma relação entre a análise sensorial e instrumental, observando-se os atributos sabor e textura e os valores de pH, acidez, sólidos solúveis, densidade e viscosidade aparente (Tabelas 3.1 e 3.2, Figura 3.2). Sensorialmente o sabor é o atributo mais marcante e corresponde aos teores de acidez e açúcar do produto, onde BFP5% apresentou maior acidez, maior teor de sólidos solúveis, densidade e viscosidade em relação aos demais.

Bebida funcional elaborada com extrato de soja e suco de laranja, em diferentes concentrações, foi avaliada sensorialmente correlacionando-se a concentração de proteína e ácido cítrico. Bebidas com teores de 37% de extrato e 18,2% de suco concentrado obtiveram os melhores escores (7,6 a 6,8) em teste de aceitação com escala hedônica estruturada de nove pontos (VALIM et al., 2003), evidenciando a importância do sabor. Moreira et al. (2005) desenvolveram e avaliaram iogurte de soja enriquecido com vitaminas e minerais. Sensorialmente o

produto apresentou sabor, odor e aparência agradáveis, com excelente aceitação por provadores semi-treinados, obtendo média 8,7 em escala hedônica de 9 pontos, demonstrando a possibilidade de utilização do extrato em produto fermentado com características sensoriais adequadas.

Constata-se que, em relação ao índice de aceitabilidade (IA) (Figura 3.2), a BFP5% foi a mais aceita em relação aos atributos textura, sabor e impressão global. Quanto à aparência e ao aroma, o ENF apresentou maior aceitabilidade. O fator decisivo na aceitabilidade geral foram os atributos aparência (67%), textura (59,7%) e o sabor (58%). Ficou evidenciado pelos resultados (Tabela 3.2 e Figura 3.2) que o atributo sabor foi o aspecto mais pronunciado e, apesar da adição de sacarose, o produto não atendeu às exigências do consumidor, sendo necessário testar-se nova formulação.

O conteúdo de sólidos do extrato de soja tem efeito sobre a concentração de ácidos produzidos durante a fermentação, sendo as bebidas com valores menores que 6,5°Brix as de menor acidez, com coágulo sem firmeza, baixa viscosidade e alta sinerese no produto fermentado (QUICAZÁN; SANDOVAL; PADILLA, 2001). Os dados obtidos neste estudo (incluindo análise sensorial e objetivamente análise físico-química) concordam em parte com a citação anterior, tendo em vista que a BFP5% obteve 6,0°Brix, maior acidez e viscosidade e maior aceitabilidade quanto à textura.

Os maiores índices de aceitabilidade de BFP5% quanto ao sabor, textura e qualidade global concordam com Favaro Trindade et al. (2001), segundo os quais há preferência dos provadores por extrato adoçado com sacarose, pois esse açúcar mascara o “sabor de feijão” do extrato de soja.

Em análise sensorial de bebida pasteurizada à base de proteína de soja, sabor pêssego, Neves, Soares e Gomes (2005) verificaram boa aceitabilidade para o produto, com média 7,34 (escala hedônica estruturada de 9 pontos), indicando que a bebida pode ser absorvida pelo mercado consumidor.

Estudo sobre a informação nutricional e atitude do consumidor relatou que o motivo pelo qual os consumidores brasileiros não compram bebidas fermentadas contendo bactérias consideradas benéficas é o sabor, mencionado por 30% dos entrevistados. O “leite de soja” teve como fatores limitantes o sabor inadequado e o preço elevado, mencionados por 62% e 14%, respectivamente. Em média, no Brasil e na América Latina, o motivo “sabor” foi apontado por 50% dos entrevistados como limitante (ACNIELSEN, 2005).

3.2 Preferência de bebida de soja fermentada probiótica

Em virtude dos resultados anteriores (Tabela 3.2 e Figura 3.2) ficou evidente que o atributo sabor foi o aspecto decisivo na aceitação, e apesar da adição de sacarose, esta não atendeu às exigências do consumidor, por isso testaram-se novas formulações (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Valores de pH, sólidos solúveis e acidez titulável de bebida de soja fermentada probiótica elaborada com concentrações de açúcar de 8% (BFP8%), 10% (BFP10%) e 12% (BFP12%), ao final de 8 horas de fermentação, a 37°C

Determinação*	BFP8%	BFP10%	BFP12%
pH	4,32	4,39	4,39
Sólidos solúveis (°Brix)	9,8	11,6	13,6
Acidez (% em ácido láctico)	0,525	0,448	0,449

* Valores correspondentes à média de três repetições.

Após oito horas de fermentação as bebidas apresentaram valores semelhantes de pH e de produção de ácido, diferindo como era esperado no teor de sólidos solúveis, que se constitui na variável independente desse experimento. As variações no teor de sólidos solúveis correspondem às diferenças de sacarose adicionada ao produto.

A seqüência de ordenação das amostras foi substituída pelos valores propostos na Tabela de Fischer, segundo o que 1= -0,85; 2=0 e 3= 0,85. De acordo com a ANOVA (Tabela 3.4) o F calculado foi maior do que o tabelado, indicando variabilidade estatisticamente significativa entre os tratamentos. Aplicando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$), para a comparação das médias, evidenciou-se diferença entre as

amostras, sendo a amostra BFP12% a preferida em relação ao grau de doçura, pois apresentou o maior valor, correspondendo a 3 (Tabela 3.4 e 3.5).

Tabela 3.4. Análise de variância (ANOVA) dos resultados do teste de preferência - ordenação de bebida de soja fermentada probiótica elaborada com concentrações de sacarose de 8% (BFP8%), 10% (BFP10%) e 12% (BFP12%)

Causa da variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Quadrado médio	F calculado
Tratamento	2	31,74	15,87	44,08
Resíduo	258	93,98	0,36	
Total	260	125,72		

$F_{\text{tabelado}5\%} = 3,0$.

Em avaliação sensorial de preferência de iogurte de soja enriquecido com sacarose e saborizado com morango, a amostra com maior teor de sacarose foi preferida entre as demais. A adição de 4% de sacarose melhora o odor e sabor, e o acréscimo de açúcar em teores de 10% ao produto aumenta a preferência pelos provadores (WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994).

Mondragón-Bernal et al. (2005), avaliaram bebidas de soja com diferentes saborizantes para determinar o sabor ideal e padrão de doçura preferido em alimento fermentado de soja. Bebidas sabor pêssego foram preferidas, bem como aquelas adicionadas de maior teor de sacarose. Estes dados confirmam a preferência pela bebida BFP12% deste estudo, cuja doçura é mais pronunciada.

Tabela 3.5. Valores médios do teste de preferência-ordenação de bebida de soja fermentada probiótica elaborada com concentrações de sacarose de 8% (BFP8%), 10% (BFP10%) e 12% (BFP12%)

Tratamentos	BFP8%	BFP10%	BFP12%
Valores*	1,53±0,64c	1,94±0,72b	2,53±0,76a

*valor correspondente à média e ao desvio padrão das notas atribuídas por 87 provadores. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Verificou-se que 68,97% dos provadores preferiram a bebida BFP12% seguida da BFP10% (22,99%) e da BFP8% (8,05%), comprovando a preferência por produtos com maior doçura. No questionamento complementar aos provadores verificou-se que 43,68% dos provadores não têm o hábito de consumir produtos de soja ou derivados ou consomem raramente, 31,03% consomem ocasionalmente, e

25,29% dos provadores relataram consumo freqüente (3 vezes por semana ou mais).

Borrmann et al. (2006), em avaliação sensorial de bebidas à base de extrato hidrossolúvel de soja, identificaram nos segmentos que consomem habitualmente alimentos com soja maior aceitação de produtos formulados apenas com extrato e sem adição de saborizantes ou edulcorantes. Mas no geral verificaram que há preferência por extratos saborizados e adoçados. Essa tendência também foi observada neste estudo, no qual cerca de 75% do total dos entrevistados não consomem habitualmente produtos de soja ou derivados, além de preferência pelo produto mais adoçado (BFP12%).

A bebida de soja fermentada probiótica com 12% de açúcar (BFP12%), preferida pelos provadores, e o extrato de soja utilizado na sua elaboração foram caracterizados através da composição físico-química (Tabela 3.6). Também foram determinadas as concentrações de isoflavonas (Tabela 3.7) segundo a metodologia descrita por Genovese e Lajolo (2001).

Tabela 3.6. Composição físico-química do extrato de soja(ES) e bebida de soja fermentada probiótica (BFP12%)

Determinação**	ES	BFP12%
Proteínas (%)	2,96±0,34	2,46 ± 0,45
Lipídeos (%)	1,28±0,18	1,13 ± 0,25
Cinzas (%)	0,57±0,07	0,68 ± 0,09
Fibra bruta (%)	0,24±0,05	0,16 ± 0,06
Açúcares redutores	0,60±0,10	0,65 ± 0,09
Carboidratos (%)*	9,88	9,64
Sólidos totais (%)	15,53±0,05	14,71 ± 0,16
Sólidos solúveis (°Brix)	3,0	13,6
pH	6,5	4,22
Acidez (% em ácido láctico)	0,20±0,02	0,57 ± 0,02

* calculado por diferença;

** valores (média ± desvio padrão) correspondentes a três repetições.

Ciabotti et al. (2006) obtiveram em extratos elaborados com a cultivar BRS213 resultados de 93,79% de umidade, 3,26% de proteína, 1,72% de lipídios e 0,36% de cinzas, superiores a composição centesimal verificada neste estudo. Essas diferenças são normais considerando-se que há variações no processo de extração, o que resulta em percentuais diferenciados.

Na determinação de isoflavonas não foram detectadas frações dos conjugados malonil-glicosídeos ou acetil-glicosídeos, nem no extrato ou na bebida fermentada probiótica. Tal fato pode estar associado ao processamento (maceração, tratamento térmico, fermentação).

Tabela 3.7. Isoflavonas (expressos em agliconas) em extrato de soja e em bebida de soja fermentada probiótica

Isoflavonas* (mg.100g ⁻¹ de matéria seca)	Extrato de soja	Bebida fermentada de soja probiótica
Daidzina	14,38 ± 0,68	12,82 ± 0,26
Glicitina	4,83 ± 0,20	3,54 ± 0,16
Genistina	12,82 ± 0,65	9,37 ± 0,25
Daidzeína	2,17 ± 0,10	2,51 ± 0,05
Gliciteína	1,17 ± 0,06	0,71 ± 0,02
Genisteína	2,91 ± 0,04	5,64 ± 0,18
Total	38,27 ± 1,57	34,60 ± 0,47

* resultado de quadruplicatas, expressam a média ± desvio padrão.

Quanto ao teor de isoflavonas na forma de agliconas observa-se um incremento nas frações daidzeína e genisteína no produto fermentado. Este comportamento também foi observado na elaboração de tofu com a cultivar BRS213, porém em maiores percentuais (CIABOTTI et al., 2006). Em geral, o processamento não remove as isoflavonas dos alimentos protéicos de soja, exceto para concentrados preparados por extração com etanol. As formas de isoflavonas podem ser alteradas pelo tratamento térmico e/ou por reações enzimáticas durante a fermentação, o que explica a alteração (ANDERSON; WOLF, 1995).

Em relação ao teor total de isoflavonas observou-se uma redução na bebida fermentada de 38,27 para 34,60 mg.100g⁻¹, o que é inferior ao citado na literatura onde se referencia que produtos não fermentados têm concentrações 2 a 3 vezes maiores do que os fermentados (GÓES-FAVONI, 2007). Além disso, é citado que a distribuição das frações de isoflavonas difere nesses dois grupos de produtos, ou seja, fermentados apresentam predominantemente agliconas enquanto que os não fermentados apresentam maiores concentrações de β-glicosídeos. (WANG; MURPHY, 1996; GÓES-FAVONI et al., 2004; MANDARINO; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV, 2006; GÓES-FAVONI, 2007). A ação de β-glicosidases é a

principal causa dessa alteração, juntamente com a ação das altas temperaturas aplicadas durante o processamento.

4 Conclusão

A bebida fermentada com microrganismo probiótico adicionada de 12% de sacarose (BFP12%) é a preferida pelos consumidores, evidenciando a importância da adição de um agente adoçante à bebida, o que não influencia a fermentação.

CAPÍTULO 4 – VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus* NCFM EM BEBIDA DE SOJA FERMENTADA PROBIÓTICA DURANTE O ARMAZENAMENTO

1 Introdução

Processos fermentativos têm sido recomendados para o desenvolvimento de alimentos à base de soja, sobrepondo, dessa maneira, as limitações sensoriais (sabor, textura) e fisiológicas (flatulência), e melhorando a aceitabilidade desses produtos. O crescimento de bactérias probióticas ácido-lácticas em extrato de soja tem sido proposto como meio para a redução significativa no conteúdo de oligossacarídeos não digeríveis (rafinose e estaquiose), além da intensificação do sabor ácido agradável e aumento, proporcionalmente, de outros açúcares como frutose e sacarose (CHOU; HOU, 2000; ASHAYE et al., 2001; WANG; YU; CHOU, 2002; BERNAL, 2004; GARRO; VALDEZ; GIORI, 2004).

O consumo de extrato de soja e de produtos que o utilizam está se tornando uma alternativa freqüente, seja pelos benefícios potenciais à saúde ou àqueles relacionados à redução do risco da ocorrência e/ou de sintomas decorrentes de doenças crônicas, osteoporose, entre outras. Além disso, atende a demanda por alimentos específicos para pessoas com atitudes vegetarianas (CANGANELLA et al., 2000).

O extrato de soja tem sido usado como meio de cultura para o crescimento de bactérias ácido-lácticas, além do desenvolvimento de produtos fermentados como o queijo (tofu) e o iogurte de soja (CHOU; HOU, 2000; BERNAL, 2004; GARRO et al., 1999; GARRO; VALDEZ; GIORI, 2004). Dentre estas bactérias destaca-se a espécie *Lactobacillus acidophilus* que, além dos benefícios em termos de

nutrição e saúde, pode contribuir para melhorar o sabor do produto final produzindo uma acidificação reduzida durante a armazenagem pós-processamento (GOMES; MALCATA, 1999b; BERNAL; 2004).

Os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, dentre outros açúcares (sacarose, glicose, frutose, galactose), as vitaminas do complexo B e as proteínas, tornam o extrato de soja um meio complexo e excelente substrato para crescimento de bactérias consideradas probióticas como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., empregadas puras ou em culturas mistas (TAMIME; MARSHALL; ROBINSON, 1995; CHOU; HOU, 2000; HOU; YU; CHOU, 2000; BERNAL, 2004).

Leites fermentados por *Lactobacillus acidophilus* são produtos ácidos cujo aroma característico pronunciado deve-se ao desenvolvimento de metabólitos, principalmente ácido láctico. Sua produção exige condições extremas de assepsia na inoculação e manipulação devido ao crescimento lento do probiótico. O inóculo deve ser de 2 a 5% do volume total, alcançando acidez final de 0,6 a 1,0%, sendo recomendado 0,65% para que mantenha a viabilidade e temperatura de 5 a 10°C durante o armazenamento (BERNAL; 2004). A definição da temperatura de estocagem de produtos fermentados contendo probióticos é fundamental para a viabilidade dos mesmos. Lourens-Hattingh e Viljoen (2001) mostraram que as maiores taxas de sobrevivência de bactérias lácticas foram obtidas nas menores temperaturas.

Em virtude das características individuais das bactérias quanto à taxa de crescimento, metabolismo, atividade proteolítica e promoção de sabor, o sucesso da adição de probióticos dependerá da espécie, linhagem, possíveis interações com outras bactérias lácticas, condições de fermentação, pH do produto, presença de oxigênio e temperatura de estocagem (GARRO et al., 1999; VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000; ZACARCHENCO, 2003; FERREIRA, 2005).

A acidez dos produtos fermentados torna-os relativamente estáveis por inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas, onde o pH pode variar de 3,6 a 4,2, podendo atingir pH final de até 4,5. Nesta faixa de pH ocorre crescimento normal das bactérias lácticas sem prejuízos ao produto (RODAS et al., 2001). Fatores como

baixo pH e alta concentração de sal podem causar inibição do crescimento de bactérias ácido-lácticas, porém não modificam o metabolismo dos carboidratos e formação de metabólitos (OLIVEIRA et al., 2002; GARRO; VALDEZ; GIORI, 2004).

O valor do pH está relacionado com o aspecto visual do produto durante sua conservação sob refrigeração, sendo importante um controle rigoroso a fim de se evitarem possíveis separações de fases, acidificação elevada, além de alterações sensoriais que poderão tornar o produto inaceitável (THAMER; PENNA, 2005).

O probiótico é geralmente escolhido de acordo com a temperatura de incubação e a isomeria do ácido láctico produzido. Este último modula o valor nutricional, limitando seu uso por parte da população, já que a transformação da forma bioquímica D(-) para L(+), a qual é a forma fisiologicamente ativa, é uma mudança de difícil ocorrência em organismos jovens, principalmente crianças (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; FERREIRA, 2005).

A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é uma característica fundamental, devendo alcançar e manter populações elevadas até o momento do consumo para que se observem os efeitos benéficos advindos da sua ingestão. Assim, alimentos probióticos devem conter culturas viáveis em contagens superiores a 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama ou mililitro, pois desta forma, irão alcançar o intestino com um número de células mais elevado resistindo ao suco gástrico e à bile e sobrevivendo a passagem no trato digestivo (BARRETO et al., 2003; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; SAAD, 2006; THAMER; PENNA, 2006).

Considerando os fatores que interferem na viabilidade das bactérias probióticas no alimento, esse trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM (LA-NCFM) e a estabilidade físico-química em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento refrigerado.

2 Material e métodos

2.1 Material

Foram utilizados grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merril], “Embrapa BRS-213” (safra 2004), provenientes da Embrapa Soja (Londrina, PR), com a seguinte composição centesimal: umidade 5,11%; lipídeos, 20,02%; proteínas, 35,57%; cinzas, 5,51%; fibras, 5,13% e carboidratos (por diferença) 28,66% (AOAC, 2003).

A cultura probiótica empregada foi *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM (*North Carolina Food Microbiology*), na forma liofilizada, cedida pela Danisco Brasil Ltda.

2.2 Elaboração do extrato de soja e da bebida fermentada probiótica

A elaboração do extrato de soja, com 2% (p/p) de proteínas, o preparo do inóculo e a obtenção da bebida fermentada probiótica seguiram o procedimento descrito no Capítulo 3, item 2.3. A elaboração da bebida fermentada probiótica seguiu o fluxograma da Figura 4.1. Não houve adição de açúcar para elaboração da bebida.

Durante o processo fermentativo para obtenção da bebida foram monitorados o pH e o teor de sólidos solúveis de 2 em 2 horas, até atingir $\text{pH} \leq 4,5$. Ao final, a bebida foi resfriada até 25°C e armazenada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, para acompanhamento de sua vida útil.

A estabilidade da bebida de soja fermentada probiótica no período de 28 dias de armazenamento, em intervalos de 7 dias, foi avaliada determinando-se, em triplicata, pH, sólidos solúveis, acidez titulável, teor protéico e contagem de células viáveis.

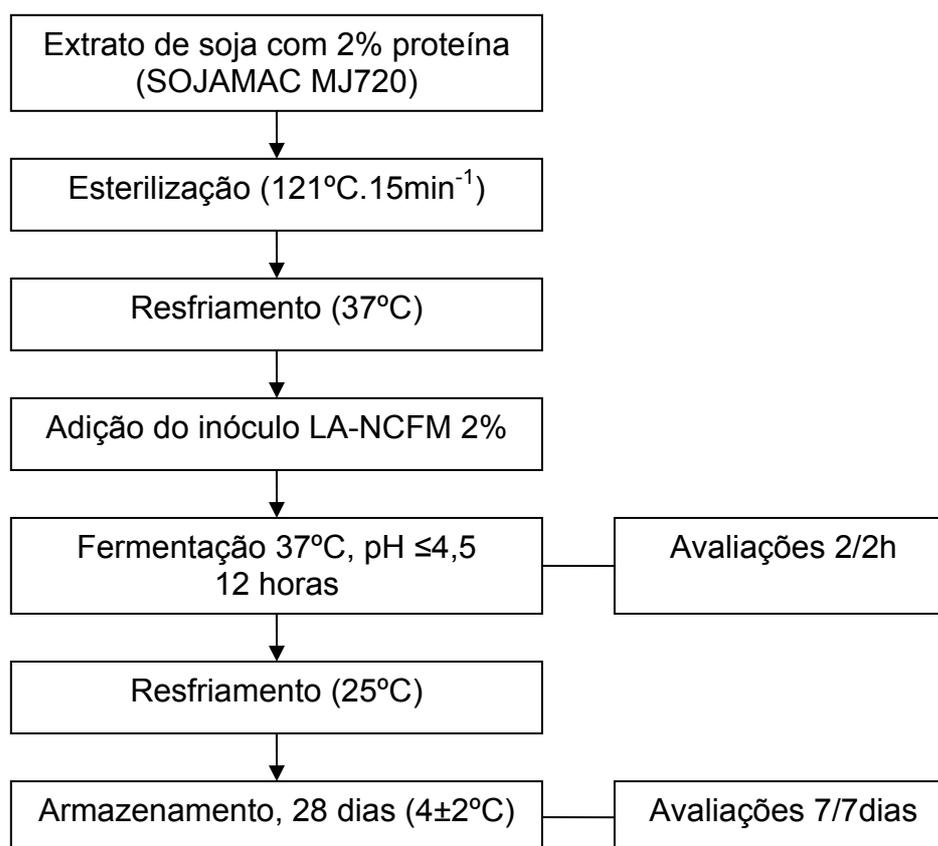


Figura 4.1. Fluxograma de elaboração da bebida de soja fermentada probiótica

O pH foi determinado com potenciômetro digital (pHmeter Digimed DM-20); os sólidos solúveis com refratômetro manual (ATAGO N-1E) e expressos em graus Brix; a acidez titulável foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1N (AOAC nº 947.05) e expressa em porcentagem de ácido láctico; o teor proteico pelo método Kjeldahl (AOAC 99120), expresso em porcentagem, considerando-se o fator de correção 6,25.

A determinação de células viáveis foi realizada pela técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se ágar MRS, preparado de acordo com as instruções do fabricante. As placas, em duplicata, foram incubadas a 37°C, durante 72 horas, conforme Oliveira et al. (2002), em jarras herméticas com emprego de geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac, São Paulo, SP). As colônias foram contadas e o resultado expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro ($\log\text{UFC.mL}^{-1}$).

A confirmação da identidade da cultura foi realizada através de coloração de Gram, teste da catalase e da fermentação dos principais açúcares (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

2.3 Análise estatística

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado. Os valores médios e o desvio padrão foram calculados dos dados obtidos das análises em triplicata, com exceção da contagem celular que foi realizada em duplicata. Esses dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey 5% para comparação de médias.

3 Resultados e discussão

O extrato de soja apresentou inicialmente os valores de pH, sólidos solúveis, acidez titulável e proteína de 6,49; 3,0°Brix; 0,160%; 2,49%, respectivamente. Após oito horas de fermentação (tempo 0), a bebida probiótica apresentou os valores 4,41; 1,5°Brix; 0,449% e 2,32% para as mesmas determinações (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Valores de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, proteínas e viabilidade celular de LA-NCFM, obtidos em intervalos de 7 dias, em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento de 28 dias, a 4±2°C

Período (dias)	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Acidez titulável (% de ácido láctico)	Proteínas (%)	Células viáveis (logUFC. mL ⁻¹)
0	4,41a	1,5a	0,449c	2,32c	14,76
7	4,33a	2,0a	0,526b	2,96a	14,89
14	4,42a	2,0a	0,450c	2,34c	13,39
21	4,29a	2,0a	0,690a	2,32c	14,30
28	4,37a	2,4a	0,523c	2,65b	14,51

Valores correspondentes à média de três determinações, com exceção de células viáveis que corresponde a duas determinações.

Médias nas colunas, seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste Tukey (p≤0,05).

O valor de pH na bebida fermentada probiótica variou de 4,41 a 4,37 ao final de 28 dias, diferença considerada não significativa (p≤0,05). Conforme Oliveira et al. (2002), diminuições no pH menores que 0,12 unidades são decréscimos não perceptíveis e podem ser considerados estáveis. Fato similar foi observado com os

sólidos solúveis que em maior concentração variaram entre 1,5 e 2,4°Brix, sem apresentar diferença significativa ($p \leq 0,05$). Neste estudo não houve adição de açúcar, e o aumento no teor de sólidos, apesar de não ser significativo, pode ser decorrente da hidrólise dos oligossacarídeos presentes. Em estudo anterior, Quicazán, Sandoval e Padilla (2001) observaram degradação dos oligossacarídeos em bebida de soja fermentada. Da mesma forma, Kaplan e Hutkins (2000) confirmaram a utilização de frutooligossacarídeos (FOS) por *Lactobacillus acidophilus* NCFM ao investigarem a fermentação de FOS por bactérias ácido-lácticas e bifidobactérias.

O percentual de proteínas variou de 2,32-2,65%, (variação de 0,33 pontos percentuais) correspondendo a um acréscimo de 14,22% durante o período. Observa-se uma elevação no teor protéico ao final da primeira semana de 0,64%, seguido de uma diminuição que permanece constante nas duas semanas seguintes, para no final do período, aos 28 dias, apresentar novo incremento de 0,33 pontos percentuais (Tabela 4.1 e Figura 4.2).

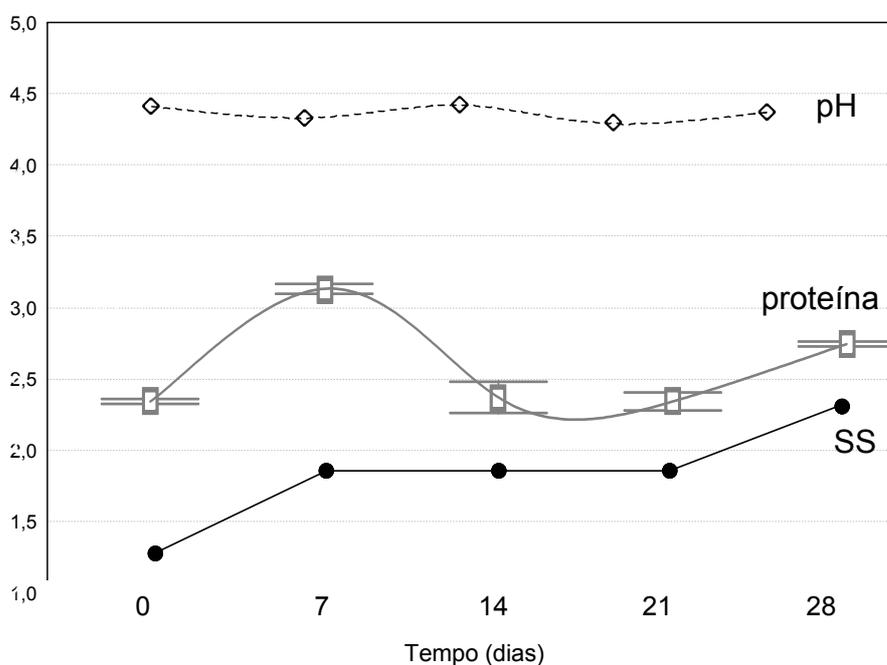


Figura 4.2. Variação de pH, sólidos solúveis (SS em °Brix) e proteínas (%) em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento sob refrigeração a $4 \pm 2^\circ\text{C}$

A acidez titulável aumentou durante o armazenamento, atingindo o valor máximo aos 21 dias. No período total houve um acréscimo de 0,074 pontos percentuais em ácido láctico variando de 0,449 a 0,523% (Tabela 4.1, Figura 4.3).

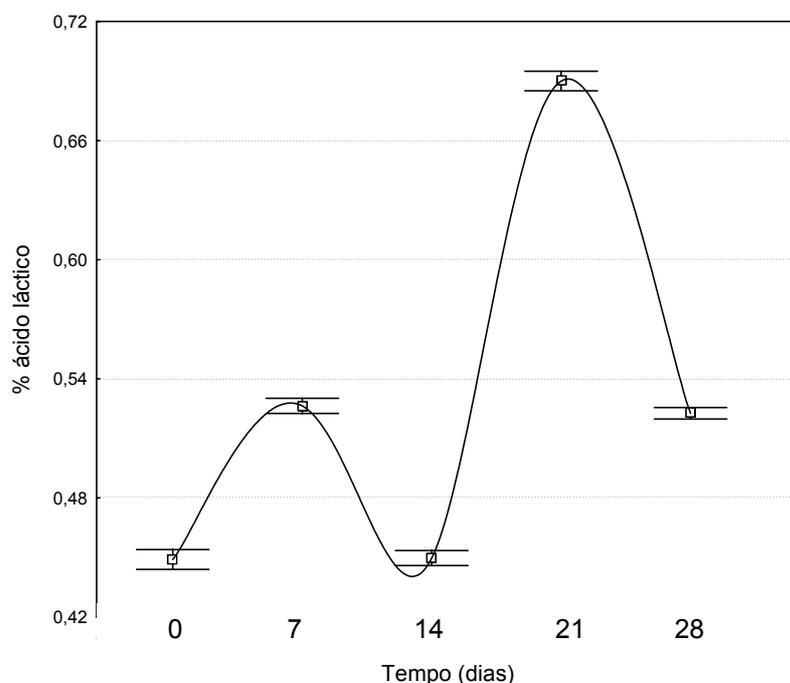


Figura 4.3. Acidez (% ácido láctico) em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento sob refrigeração a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$

A viabilidade celular variou de $14,76\log\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $14,51\log\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, evidenciando a adaptação do microrganismo ao extrato de soja durante o período de armazenamento (Tabela 4.1, Figura 4.4). O número de células viáveis é superior ao estabelecido na legislação, ou seja, $6,0\log\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, valor de referência para produtos contendo microrganismos probióticos (BRASIL, 2002). Alguns autores mencionam perda da viabilidade na faixa de pH 4,0, porém tal fato pode estar vinculado à linhagem utilizada. A variação de pH pode estar relacionada ao tipo e porcentagem de cultura utilizada, sua atividade e valor no final da fermentação, presença de diferentes ingredientes e tempo de armazenamento (SHAH et al., 1995; ZACARCHENCO, 2003; THAMER; PENNA, 2006).

A identidade da cultura foi confirmada como *Lactobacillus acidophilus*. As colônias apresentaram-se gram-positivas e catalase-negativas, características

básicas de lactobacilos, e com morfologia e perfil de fermentação característicos, de acordo com Bergey (1994) e Altermann et al. (2005).

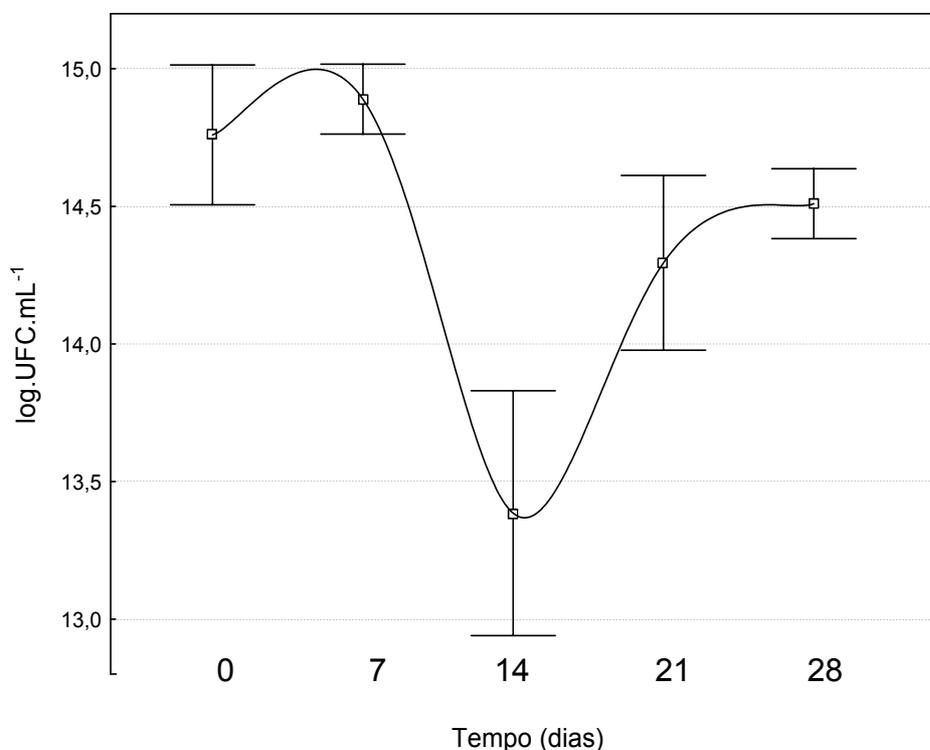


Figura 4.4. Contagem de *Lactobacillus acidophilus* - NCFM em bebida de soja fermentada probiótica durante o armazenamento sob refrigeração a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Analisando-se as Figuras 4.3 e 4.4, verificou-se que a viabilidade de LA-NCFM estava associada à concentração de ácido láctico presente no meio, quando ao final de 14 dias ocorreu uma redução acidez e também no número de células viáveis. Com a diminuição da acidez pode ocorrer o crescimento de antagonistas presentes naturalmente no produto. Este fato pode ser relacionado ao crescimento e morte celular associados ao teor de ácido do meio e a produção deste pelos microrganismos.

Oliveira et al. (2002) registraram a redução de dois ciclos logarítmicos, em produtos lácteos fermentados adicionados de outras culturas, após 28 dias de armazenamento, porém citaram a redução de 1 ciclo para fermentações utilizando somente *Lactobacillus acidophilus*. Zacarchenco (2003) avaliando bebidas lácteas fermentadas somente por *Lactobacillus acidophilus* ou em associação com outros microrganismos, durante um período de 21 dias de armazenamento refrigerado,

observou redução nas contagens de células viáveis de cerca de um ciclo logarítmico (8,87 para 8,08logUFC.mL⁻¹). Culturas concentradas congeladas de LA-NCFM testadas quanto à viabilidade durante armazenamento a -20°C demonstraram, após seis semanas, perda de apenas um quarto de ciclo logarítmico na sua viabilidade (SANDERS, KLAENHAMER, 2001) concordando com esse estudo.

As características de iogurte de soja probiótico suplementado com prebióticos (oligofrutose e inulina) e não suplementado, foram avaliadas durante seu armazenamento de 28 dias, a 4°C, em intervalos de 7 dias. Em iogurte não suplementado houve redução do pH em 0,2 unidades, incremento na acidez de 0,18% e diminuição na viabilidade celular a partir do 21º dia, atingindo valores de 5,36logUFC.mL⁻¹ (FUCHS et al., 2005).

Canganella et al. (2000) estudaram a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em iogurtes manufacturados com extrato de soja durante armazenamento de 45 dias em duas temperaturas. Observaram que apesar de reduzir um ciclo logarítmico ao final do período, permaneceu estável durante 30 dias quando mantido a 4°C. Em temperatura mais elevada (12°C) houve diminuição de 1 ciclo após 18 dias de armazenamento, e de 2 ciclos logarítmicos ao final do período, evidenciando a melhor manutenção do microorganismo em temperaturas de refrigeração próximas a 4°C.

Buriti, Rocha e Saad (2005) avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em queijo minas frescal durante o armazenamento por 21 dias a 5°C e verificaram boa viabilidade do probiótico que se manteve com valor médio de 6,3logUFC.mL⁻¹, em pH ao redor de 6,5. A importância da temperatura de armazenamento na preservação do probiótico também foi observada por Wang, Yu e Chou (2002). Nesse estudo, com bebidas à base de extrato de soja fermentado com bifidobactérias e bactérias ácido-lácticas, incluindo *Lactobacillus acidophilus*, verificaram que os valores de pH das bebidas, com e sem adição de sacarose, apresentaram pequenas variações, quando o produto foi mantido a 5°C.

Gomes e Malcata (1999a) mencionam que a sobrevivência dos probióticos também está relacionada com a acidez, que ao elevar-se, resulta em perda de

viabilidade, a exemplo do que ocorre com iogurtes lácteos. Complementam a citação sugerindo que deve-se selecionar probiótico mais resistente, ou substituir o veículo alimentar ou aumentar a proteção através de microencapsulação.

O extrato de soja neste estudo mostrou-se uma alternativa viável de veículo alimentar para o crescimento e sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus*, sem alterações marcantes no pH, sólidos solúveis e acidez titulável do produto armazenado a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

4 Conclusões

Bebida probiótica fermentada à base de extrato de soja mantém as suas características físico-químicas e a viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM durante 28 dias de armazenamento a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A bebida de soja fermentada probiótica atende à legislação brasileira que exige a presença mínima de 10^6UFC.mL^{-1} de microrganismos probióticos, podendo apresentar potenciais benefícios para a saúde.

CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE BEBIDA DE SOJA FERMENTADA PROBIÓTICA

1 Introdução

Durante os últimos trinta anos houveram elevações substanciais nos percentuais de mortalidade por causas cardiovasculares no contexto nacional e internacional. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), essa tendência de elevação na incidência de doenças cardiovasculares tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade. Os principais fatores de risco associados são a propensão genética, tabagismo, hipertensão, diabetes melito, obesidade e dislipidemias (SPOSITO et al., 2007). A hipercolesterolemia destaca-se como importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, uma das principais causas de mortalidade em ocidentais (ROSSI et al., 2000; TARANTO et al., 2000).

Alimentos funcionais têm sido amplamente pesquisados e desenvolvidos no intuito de propiciar alternativas alimentares na prevenção da ocorrência de algumas enfermidades como a hipercolesterolemia. Neste contexto destacam-se os alimentos à base de soja e os com adição de probióticos (TARANTO et al., 2000; AMORES et al., 2004; GUIMARÃES, 2005).

A soja é considerada um alimento funcional devido à presença de fitoquímicos que auxiliam na redução/controle de diversos sintomas e na prevenção de patologias, particularmente as cardiovasculares. Os componentes funcionais mais citados são as isoflavonas, oligossacarídeos, saponinas, ácidos graxos

essenciais, vitaminas e proteínas (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV; MANDARINO, 2006).

A ingestão diária de 25g de proteína de soja é recomendada para o controle dos níveis de colesterol e triglicerídeos, quando associada a uma dieta com baixos níveis de gordura saturada e colesterol. Esta quantidade pode reduzir o LDL-colesterol (*Low Density Lipoprotein*) plasmático em cerca de 6%, sendo considerada como auxiliar no tratamento da hipercolesterolemia (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994; HASLER, 1998; CHOU; HOU, 2000; RODRIGUES, 2003; ZHOU, 2004; MA et al., 2004; WILLE; PEDROZO; FREITAS, 2004; GUIMARÃES, 2005; EMBRAPA SOJA, 2007; SPOSITO et al., 2007). Os dados disponíveis são ainda contraditórios quanto aos efeitos sobre os triglicerídeos e o HDL-colesterol (*High Density Lipoprotein*), havendo indícios do aumento de HDL. São necessários estudos com maiores casuísticas e delineamentos mais específicos para confirmar essa hipótese (SPOSITO et al., 2007).

A soja é a principal fonte dietética de isoflavonas, fitoquímico cuja estrutura é semelhante ao hormônio estrógeno, as quais podem ter ação antiestrôgenica, podendo reduzir riscos da incidência de câncer de mama, de colo do útero e de próstata; e estrogênica, podendo atenuar as implicações negativas da menopausa e reduzir o risco de osteoporose em mulheres (GÓES-FAVONI et al., 2004). Apresentam ação protetora contra a oxidação do LDL-colesterol através da redução de radicais livres, quelação de íons metálicos e regeneração de α -tocoferol. Reduzem as cardiopatias e trombozes e a síntese de estrógeno através da inibição da agregação plaquetária (ANJO, 2004).

O teor de isoflavonas na maioria dos alimentos de soja varia de 100 a 300mg.100g⁻¹. A concentração e o tipo de isoflavonas dependem das condições de processamento, principalmente temperatura. Produtos não fermentados têm concentração 2 a 3 vezes maiores que os fermentados, Entretanto, a distribuição dos constituintes difere nesses dois grupos: produtos fermentados apresentam predominantemente agliconas (genisteína, daidzeína), devido ao aumento na atividade da enzima β -glicosidase, enquanto que os não fermentados apresentam maiores concentrações de β -glicosídeos. As formas agliconas são mais reativas do

ponto de vista funcional (GÓES-FAVONI et al., 2004; MANDARINO; CARRÃO-PANIZZI; CRANCIANINOV, 2006; GÓES-FAVONI, 2007).

Os oligossacarídeos da soja, conhecidos como fibra alimentar, também são relacionados a sua ação funcional fisiológica. Apresentam efeito na redução do colesterol sanguíneo e diminuição do risco de desenvolvimento de câncer, relacionados aos mecanismos de retenção de substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal durante processos digestivos; redução do tempo do trânsito intestinal e do contato do tecido intestinal com substâncias mutagênicas ou carcinogênicas; e fermentação bacteriana dos compostos da alimentação promovendo a formação de substâncias protetoras (ANJO, 2004)

A ingestão de bactérias probióticas ácido-lácticas tem sido apontada como terapêutica complementar e natural para diminuir as concentrações de colesterol sérico em humanos. Estudos mencionam diminuição do colesterol durante o consumo diário de quantidades elevadas de produtos lácteos fermentados. Este efeito deve-se a metabolização no intestino dos carboidratos não-digeríveis provenientes dos alimentos pelas bactérias probióticas. Os ácidos graxos de cadeia curta resultantes possivelmente causam diminuição das concentrações sistêmicas dos lipídeos sanguíneos, através da inibição da síntese de colesterol hepático e/ou da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado. Apesar de poucos estudos clínicos de curta duração terem sido realizados, todos indicam a influência sobre os lipídeos de uma maneira similar, reduzindo os níveis de colesterol total, de colesterol LDL e de triglicerídeos. Outras hipóteses têm sido discutidas e o efeito real é ainda questionável (TARANTO et al., 1998; TARANTO et al., 2000; SAAD, 2006).

Os sais biliares são sintetizados no fígado, a partir do colesterol, de onde são secretados de forma conjugada pela vesícula biliar ao duodeno, em uma quantidade diária que varia de 500 a 700mL. Desta maneira, ao desconjugar os sais biliares o organismo tem de incrementar a produção consumindo colesterol endógeno. Estudos indicam que bactérias ácido-lácticas, em especial *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. têm capacidade de diminuir o colesterol plasmático e de metabolizá-lo. Alguns probióticos como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* degradam os sais biliares e produzem ácidos graxos de cadeia curta e esta

capacidade aumenta na presença de prebióticos como manitol e frutooligosacárideos, com destaque a inulina (TARANTO et al.; 2000; RIVAS; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2006).

Segundo vários autores (GIBSON; FULLER, 2000; JONES, 2002; RODRÍGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003; PADILHA; PINHEIRO, 2004; FRANCO, 2006) é necessária a realização de maior número de pesquisas sobre as substâncias funcionais biologicamente ativas, a fim de que se determine com precisão os efeitos benéficos, níveis mínimos e máximos de ingestão com garantia de eficácia e ausência de risco de toxicidade, além da avaliação da possível ocorrência de efeitos colaterais no uso em períodos prolongados.

Este estudo teve como objetivo demonstrar o efeito da ingestão diária de bebida de soja com potencial probiótico, fermentada com *Lactobacillus acidophilus* NCFM, em animais de laboratório, durante período experimental de 90 dias.

2 Material e métodos

2.1 Bebida de soja fermentada probiótica

Foi utilizada bebida de soja fermentada probiótica obtida e caracterizada em experimento anterior (Capítulo 3, ítems 2.3 e 3.2), formulada com extrato obtido de grãos da cultivar Embrapa BRS-213, contendo 2% de proteína, 12% de açúcar (sacarose comercial) e o microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* linhagem NCFM.

2.2 Ensaio biológico

2.2.1 Animais

O ensaio foi conduzido no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, RS, utilizando-se 35 hamsters (*Mesocricetus auratus*) da linhagem *Golden Syrian*, machos, recém-desmamados (21 dias), com peso inicial variando entre 24 e 50 gramas, e peso médio de 38,74 gramas.

O hamster apresenta o perfil de lipoproteínas bastante semelhante ao humano com a lipoproteína LDL como principal carreador de colesterol plasmático, motivos pelos quais é bastante usado em estudos de respostas de drogas e dietas no metabolismo lipídico e aterosclerose (NAVARRO et al., 2005; FROTA, 2007).

Os animais foram mantidos, individualmente, em gaiolas (Figura 5.1) produzidas em polipropileno, autoclaváveis, resistentes a ácidos, nas medidas de 41x34x16cm, com tampa de arame galvanizado, malha 7,5mm, comedouro embutido em “V”, e divisórias basculantes formando o comedouro, separado do bebedouro, e orifício com arruela dupla para introdução do bico do bebedouro. O piso da gaiola foi coberto por uma camada de maravalha (cama) para absorção de urina e água, servindo também como isolante térmico.

Durante o período experimental de 90 dias manteve-se o ambiente com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas. Na primeira semana os animais foram adaptados às condições do experimento e mantidos com dieta comercial padrão da espécie e água *ad libitum*. Após o período de adaptação, os animais foram pesados e redistribuídos, mantendo-se o peso médio dos grupos, de maneira que não houvesse diferença, ou que esta fosse mínima entre os mesmos.

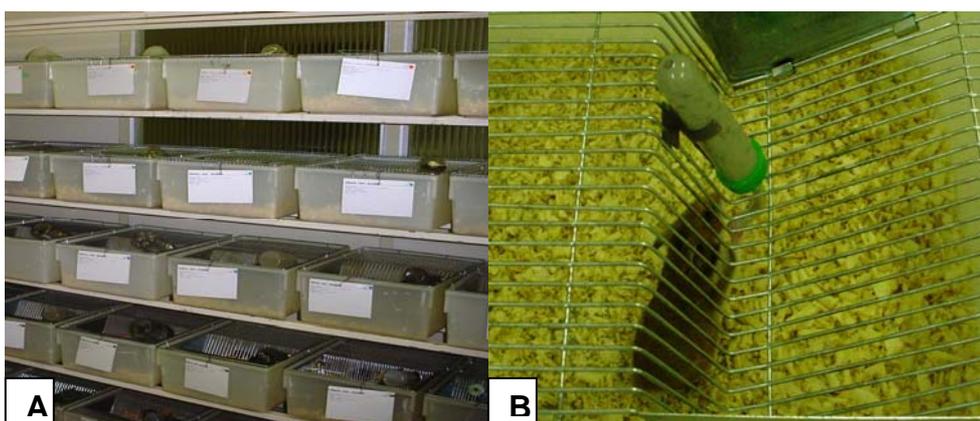


Figura 5.1. Vista do experimento no biotério (A) e do hamster recebendo a bebida experimental (B).

2.2.2 Dietas

A ração comercial utilizada foi a NuvilabCR1[®] - Nuvital, própria para roedores, apresentando como composição química aproximada os seguintes valores: umidade 12,5% máx.; proteína bruta 22,0% mín.; extrato etéreo 4,0% min.; minerais 10,0% máx.; matéria fibrosa 8,0% máx.; cálcio 1,4% máx. e fósforo 0,8% mín., dados fornecidos pelo fabricante.

A quantidade de ração fornecida (13g) foi estabelecida com base nas recomendações diárias de ingestão do animal que é de 15g para animais adultos e considerando-se os pesos mínimo e máximo atingido normalmente pelo animal macho de 20 e 130 gramas, respectivamente (BLAIR et al., 2002). De acordo com Luca et al. (1996), as necessidades nutricionais para hamsters, em % por kilograma de ração, são: fibras 5-15%; carboidratos 65%; proteínas 18-24% e lipídeos 4-20%, as quais foram observadas neste estudo.

A ração enriquecida com colesterol para o fornecimento de dieta hipercolesterolêmica foi preparada semanalmente pela dissolução do colesterol em pó (Eskisa, São Paulo) em etanol aquecido a 60°C, sendo imediatamente adicionado à ração na proporção de 0,2%, seguido de evaporação (NTANIOS; JONES, 1999; RODRIGUES, 2003).

Visando verificar possíveis efeitos associados aos componentes funcionais da bebida e não ao microrganismo probiótico, elaborou-se uma dieta com a mesma bebida fermentada probiótica objeto do estudo, porém submetida à inativação do microrganismo através de aquecimento em forno microondas, seguido de exposição à radiação ultravioleta, denominada então “bebida sem probiótico”.

A bebida fermentada probiótica foi preparada quinzenalmente, sendo feita contagem de células viáveis no produto recém-fermentado e durante o armazenamento, a fim de verificar se o produto apresentava o número mínimo para caracterização como probiótico ($6,0 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) antes da administração aos animais. Da mesma forma, era feita contagem de células viáveis na bebida sem

probiótico buscando-se monitorar a ausência/redução devido aos tratamentos de inativação (microondas e ultravioleta).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais, com 7 animais em cada grupo (n=7), de acordo com a dieta:

- Biotério (R): animais alimentados com 13g diárias de ração comercial;
- Bebida probiótica (BP): animais alimentados com 13g diárias de ração comercial + 5mL de bebida de soja fermentada probiótica;
- Bebida sem probiótico (BSP): animais alimentados com 13g diárias de ração comercial + 5mL de bebida de soja sem probiótico;
- Bebida probiótica e colesterol (BP+C): animais alimentados com 13g diárias de ração comercial enriquecida com 0,2% de colesterol + 5mL de bebida de soja fermentada probiótica;
- Bebida sem probiótico e colesterol (BSP+C): animais alimentados com 13g diárias de ração comercial enriquecida com 0,2% de colesterol + 5mL de bebida sem probiótico.

As bebidas foram administradas aos animais no período da manhã imediatamente após a retirada da ração residual e da água. O mesmo procedimento de retirada de alimento e água também era aplicado ao grupo biotério. Após consumo das bebidas todos os animais recebiam 13g de ração e água. Os animais foram pesados a cada 7 dias, em balança semi-analítica, para avaliação do ganho de peso. As dietas foram pesadas e trocadas diariamente para verificar a quantidade ingerida por animal. A partir da razão entre os valores médios de ganho de peso e de ingestão alimentar, durante os 90 dias do experimento, foi calculado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

O protocolo do estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UFPel.

2.3 Avaliações bioquímicas

Previamente à administração das dietas foram realizadas análises de colesterol total e triglicerídeos séricos em 5 animais (n=5), machos, desmamados

aos 21 dias, e alimentados com ração comercial (NuvilabCR1[®]) por duas semanas, após jejum de doze horas, para a determinação dos níveis basais daquelas variáveis.

Ao término do período experimental foram realizadas análises de colesterol total e triglicérides no plasma, e de glicose no sangue. Os animais, após jejum de 14 horas, foram anestesiados para coleta do sangue pelo método de punção cardíaca, sendo sacrificados por exangüinação. Alíquotas de sangue foram imediatamente depositadas em fitas especiais para dosagem de glicose e lidas em equipamento Accu-Chek Advantage II (Roche). O sangue coletado foi centrifugado a 1000g, por 15min. a 4°C, separando-se o soro o qual foi congelado (-20°C) para análise posterior. As determinações de colesterol total e de triglicérides foram realizadas em equipamento fotômetro "Biosystems BTS-310" semi-automático com emprego dos reativos *Biosystems reagents and instruments*.

2.4 Avaliações histopatológicas

Os animais depois de sacrificados por exanguinação tiveram seus órgãos removidos e preservados em formol tamponado a 10% (v/v). Foram coletados os seguintes órgãos: fígado, rins, pulmão, coração, baço, vesículas seminais, cérebro, intestino delgado e grosso. O fígado recém retirado foi pesado e segmentado, separando-se o lobo direito para as análises patológicas.

Foram clivados fragmentos de cada um dos órgãos e incluídos em parafina, para obtenção dos cortes histológicos com 5µm de espessura, os quais foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e Gram histológico (BEHNER; TOLOSA; FREITAS NETO, 1976). Os procedimentos foram realizados pela equipe do laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, sendo as amostras avaliadas sem o conhecimento prévio dos grupos aos quais pertenciam os animais ou das lesões relatadas no momento do sacrifício.

Através das observações histopatológicas buscou-se avaliar: a) integridade ou lesão dos diferentes órgãos; b) presença de qualquer alteração, caracterizando o processo, a distribuição e a extensão; c) presença de degeneração gordurosa

hepática (esteatose); d) integridade das vilosidades intestinais; e) quantificação subjetiva de bactérias intestinais.

2.5 Avaliações nas fezes

Na noite anterior a cada coleta das fezes foi retirada a maravalha das gaiolas dos animais e colocado papel toalha para absorção da urina. Sobre esse papel foram adaptadas telas de arame, de maneira que o animal não entrasse em contato com as fezes ou urina (Figura 2). O material era recolhido pela manhã e acondicionado em frascos estéreis, sendo levados imediatamente para o laboratório. Durante o transporte e tempo de espera para a realização das análises as amostras foram mantidas sob refrigeração ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$).



Figura 5.2. Gaiola adaptada com tela para coleta de fezes.

2.5.1 Avaliações microbiológicas

As fezes para avaliação microbiológica foram coletadas no início do experimento (contagem basal) e, em intervalos quinzenais, ao longo de 90 dias, para a contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus*. A viabilidade celular foi determinada em 1g de amostra, pela técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS – Oxoid). As placas, em duplicata, foram incubadas a 37°C , durante 72 horas, em jarras herméticas com emprego de geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac). As colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias e o resultado expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama ($\log\text{UFC.g}^{-1}$). As colônias obtidas foram

confirmadas como *Lactobacillus acidophilus* NCFM através de coloração de Gram, teste da catalase e de fermentação dos principais açúcares.

2.5.2 Determinação de lipídeos

Durante a última semana do período experimental (84^o ao 90^o dia) foram coletadas as fezes dos animais, quando da troca das camas. As amostras coletadas foram identificadas, pesadas e armazenadas sob congelamento (-20°C) para análise posterior. Os lipídeos nas fezes foram determinados, em duplicata, pela extração contínua com solvente utilizando extrator Soxhlet, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias, com os respectivos desvios padrões. Para comparação de médias do peso final, peso do fígado, colesterol, triglicerídeos, glicemia e contagem de probióticos nas fezes entre os grupos no momento final do experimento, foi realizada análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Duncan para comparação múltipla de médias, ao nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado foi o Statistica 6.0 (2001).

3 Resultados e discussão

3.1 Comportamento biológico de hamsters

As modificações ponderais observadas nos animais (Tabela 5.1) durante o período experimental, decorrentes das diferentes dietas administradas, serão discutidas a seguir.

Tabela 5.1. Peso corporal, ganho de peso, ingestão total de ração, consumo diário de ração, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e peso do fígado dos hamsters alimentados com diferentes dietas experimentais

Determinações	DIETAS **				
	R	BP	BSP	BP+C	BSP+C
Peso inicial (g)*	65,43 ± 6,65	66,14 ± 7,13	66,43 ± 5,32	68,14 ± 6,36	65,43 ± 6,48
Peso final (g)	99,29 ± 15,24 ^b	113,43 ± 9,36 ^{ab}	118,43 ± 12,39 ^a	112,71 ± 13,63 ^{ab}	105,28 ± 7,91 ^{ab}
Ganho peso total (g)	33,86	47,29	52,00	44,57	39,86
Ingestão total (g)	101,46	114,12	114,93	114,97	99,86
Consumo diário (g)	8,45 ± 1,06 ^b	9,51 ± 0,71 ^a	9,58 ± 0,79 ^a	9,58 ± 1,24 ^a	8,32 ± 0,92 ^b
CEA	0,32 ± 0,24 ^b	0,41 ± 0,28 ^b	0,45 ± 0,24 ^a	0,37 ± 0,29 ^b	0,39 ± 0,31 ^b
Peso fígado (g)	2,79 ± 0,53 ^c	3,62 ± 0,66 ^b	3,86 ± 0,53 ^b	5,87 ± 0,72 ^a	5,52 ± 0,60 ^a

*Após 7 dias de adaptação com ração comercial.

**Média ± desvio padrão.

Médias, seguidas de letras distintas na mesma linha, diferem entre si pelo Teste Duncan ($p < 0,05$).

R = dieta biotério (ração padrão);

BP = bebida probiótica (ração padrão + 5mL bebida);

BSP = bebida sem probiótico (ração padrão + 5mL bebida);

BP+C = BP acrescido de 0,2% de colesterol;

BSP+C= BSP acrescido de 0,2% de colesterol.

O peso final dos animais com a dieta biotério (R) não diferiu ($p \leq 0,05$) daqueles animais com as dietas bebida probiótica acrescidas ou não de colesterol (BP e BP+C), e com bebida sem probiótico acrescida de colesterol (BSP+C).

Em relação ao consumo médio diário e ingestão total, os grupos que receberam a dieta bebida probiótica, sem e com colesterol (BP e BP+C), e bebida sem probiótico (BSP) não diferiram entre si. O consumo diário e ganho de peso concordam com o estudo de Ntanios e Jones (1999), em ensaio com hamsters, no qual observaram valores de 8,8 a 9,3g e 25 a 40g, respectivamente. O consumo da bebida proporcionou aos animais um acréscimo médio de 3Kcal diárias, de acordo com a composição físico-química da mesma (Capítulo 3, item 3.2).

O Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), obtido pela razão entre o ganho de peso total e o consumo da dieta durante 90 dias (Tabela 5.1) foi melhor nos animais que receberam dieta sem probiótico (BSP), seguido daqueles que receberam dieta probiótica (BP), sinalizando uma melhor conversão do alimento ingerido. Os valores de CEA acompanharam os valores de ganho de peso corporal, uma vez que são variáveis relacionadas.

As médias de peso do fígado dos animais que receberam dietas hipercolesterolêmicas (BP+C, BSP+C), independente das demais características da dieta, foram superiores ($p \leq 0,05$) as daqueles que receberam dieta sem colesterol (R, BP e BSP). Os grupos hipercolesterolêmicos apresentaram um aumento de 110,39% e 97,85%, respectivamente, de peso do fígado em relação à dieta biotério (R), que foi inferior aos demais. Machado et al. (2003) constataram aumento de peso no fígado de animais alimentados com dietas contendo probiótico, colesterol e ácido cólico em relação ao padrão, e atribuem ao probiótico uma tendência a deslocar o colesterol sérico para o fígado, promovendo sua deposição nesse órgão. Tendência similar foi observada neste estudo, onde BP+C resultou em peso do fígado mais elevado do que BSP+C. Navarro et al. (2005) também observaram aumento significativo no peso do fígado, em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica, de 140 a 155%, além de induzirem ao aumento do conteúdo hepático de colesterol.

Ao relacionar-se o peso do fígado com o peso corporal observou-se uma relação de cerca de 3% nos animais com as dietas biotério (R), bebida probiótica (BP) e bebida sem probiótico (BSP), enquanto aqueles que receberam colesterol (BP+C e BSP+C) apresentaram uma relação de 5%. O fígado destes animais também se apresentou gorduroso, com esteatose e alteração da coloração normal, em decorrência de seu papel no metabolismo das gorduras, e provavelmente a um incremento no conteúdo hepático de colesterol total, livre e esterificado.

3.2 Colesterol sérico total, triglicerídeos e glicemia em hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica

A concentração sérica de colesterol total obtida no início do período experimental (basal) é superior à mencionada em outros estudos com hamsters. Nistor et al. (1987) menciona variações na concentração sérica basal de hamsters de $0,98\text{mmol.L}^{-1}$ a $2,96\text{mmol.L}^{-1}$, enquanto Frota (2007) menciona valores de $1,04\text{mmol.L}^{-1}$ a $2,34\text{mmol.L}^{-1}$. A concentração basal de triglicerídeos séricos concorda com o mencionado por Frota (2007) com variações de $1,41\text{mmol.L}^{-1}$ a $2,42\text{mmol.L}^{-1}$. Além da dieta e características individuais, fatores como genótipo e condições ambientais também podem influenciar as frações lipídicas séricas destes animais.

No final do período experimental (90 dias), as concentrações de colesterol e triglicerídeos foram inferiores nos animais que receberam a dieta biotério (R). Nos grupos aos quais foi acrescido colesterol à dieta (BFP+C e BF+C) a concentração de colesterol total foi significativamente superior aos demais tratamentos ($p \leq 0,05$), conforme Tabela 2. Evidencia-se, com isso, que o probiótico não apresentou o efeito esperado nos animais, pois o teor de colesterol total do grupo com dieta incluindo a bebida probiótica (BP) não apresentou diferença em relação àqueles que não receberam probiótico (R e BSP) (Tabela 2, Figura 3). Embora existam inúmeras citações de que derivados de soja (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994; BALMIR et al., 1996; ESTEVES; MONTEIRO, 2001; RODRIGUES, 2003; ZHOU, 2004) e fermentados probióticos (TARANTO et al., 1998; 2000; CHOU; HOU, 2000; ROSSI et al., 2000) contribuam para prevenir o aumento e/ou reduzir a concentração de colesterol plasmático, este comportamento não foi observado neste trabalho. A

causa dessa diferença não foi demonstrada, mas pode ser associada a menor concentração de proteínas destas bebidas, teor de probiótico ingeridos ou de colesterol adicionado as dietas. Esse último provocou lesões graves, do ponto de vista patológico, que podem ter mascarado o efeito promovido pelo probiótico administrado com a dieta (BP+C).

Tabela 5.2. Concentrações (mmol.L⁻¹) de colesterol, triglicerídeos e glicose em hamsters submetidos a diferentes dietas durante 90 dias

Dietas	Colesterol total*	Triglicerídeos*	Glicemia*
Basal**	3,46 ± 0,47	2,00 ± 0,39	nd***
R	3,11 ^b ± 0,15	1,12 ^c ± 0,27	6,53 ^a ± 2,33
BP	3,26 ^b ± 0,20	1,51 ^{ab} ± 0,16	7,43 ^a ± 1,72
BSP	3,67 ^b ± 0,57	1,36 ^{bc} ± 0,21	6,26 ^a ± 1,62
BP+C	7,77 ^a ± 0,94	1,71 ^a ± 0,34	6,94 ^a ± 1,61
BSP+C	8,01 ^a ± 1,11	1,78 ^a ± 0,42	6,67 ^a ± 1,63

*Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna, diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Média ± desvio padrão (n =7).

** medida basal no início do experimento, animais com dieta biotério (n=5).

*** nd = não determinado.

Dietas: R = dieta biotério (ração padrão); BP = bebida probiótica (ração padrão + 5mL bebida); BSP = bebida sem probiótico (ração padrão + 5mL bebida); BP+C = BP acrescido de 0,2% de colesterol; BSP+C = BSP acrescido de 0,2% de colesterol.

Naidu, Bidlack e Clemens (1999) atribuem o efeito hipocolesterolêmico à inibição enzimática da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA) que é limitante na biossíntese do colesterol endógeno. Outro mecanismo proposto associa o aumento da excreção do colesterol dietético nas fezes pela co-precipitação na presença de ácidos biliares desconjugados no intestino e/ou absorção pelo organismo.

Da mesma forma, os triglicerídeos dos grupos que receberam dieta com colesterol (BP+C e BSP+C) apresentaram valores superiores aos demais grupos ($p \leq 0,05$), porém o grupo cuja dieta incluía probiótico (BP) não diferiu desses e nem do grupo BSP. O grupo dieta biotério (R) apresentou concentração de triglicerídeos inferior aos demais, com exceção do grupo BSP. Nota-se que as dietas experimentais propiciaram um aumento na concentração de triglicerídeos, em relação à dieta biotério (R), com maior incremento naquelas acrescidas de

colesterol. A bebida fermentada probiótica conferiu um aporte lipídico equivalente a 1,13% (em 100mL de produto), o que influenciou na diferença entre as dietas experimentais e a dieta biotério.

Naidu, Bidlack e Clemens (2000) mencionam estudos em que a suplementação com probióticos não propiciou significativa resposta na concentração de triglicerídeos nem no número de bactérias ácido-lácticas nas fezes.

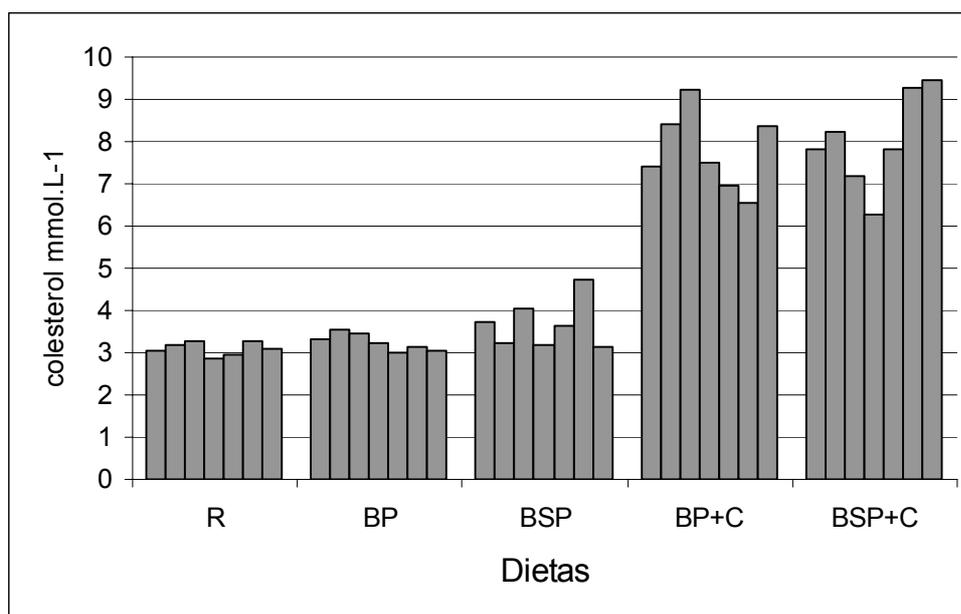


Figura 5.3. Concentração de colesterol no plasma de hamsters alimentados com dietas experimentais ao final de 90 dias.

Dietas: R = dieta biotério (ração padrão); BP = bebida probiótica (ração padrão + 5mL bebida); BSP = bebida sem probiótico (ração padrão + 5mL bebida); BP+C = BP acrescido de 0,2% de colesterol; BSP+C = BSP acrescido de 0,2% de colesterol.

Os grupos alimentados com a dieta biotério (R) e com a bebida probiótica (BP) apresentaram valores séricos de colesterol com maior homogeneidade intragrupal, confirmado pelos valores do desvio padrão, dado que não foi observado nos demais grupos (BSP; BP+C; BSP+C). Esse comportamento não foi verificado em relação aos triglicerídeos onde maior heterogeneidade dos valores séricos foi observada naqueles com dietas acrescidas de colesterol (BP+C; BSP+C) (tabela 2).

Em estudo de Rossi et al. (2000), foi observada redução de colesterol sérico em coelhos hipercolesterolêmicos alimentados com produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e ração adicionada de 0,15% de colesterol, quando administrados

em quantidades de 10mL por animal.dia⁻¹. Esses autores atribuem a ação desta bactéria à precipitação de colesterol no intestino como a principal causa da diminuição da absorção. De modo similar, Balmir et al. (1996) observaram diminuição do colesterol total sérico em hamsters normocolesterolêmicos alimentados com isolado protéico de soja, comparado à dieta caseína, demonstrando que a origem da proteína influencia a concentração de lipídeos séricos.

Os resultados observados neste estudo, contraditórios a maioria dos trabalhos publicados, indicam que a bebida de soja com ou sem o probiótico não influencia nos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos de hamsters hipercolesterolêmicos. Este comportamento sugere que as afirmações acerca dos benefícios da soja e dos probióticos, isolados ou conjuntamente, podem ser questionadas. Obviamente, a análise dos efeitos potenciais deve levar em consideração variáveis como concentração dos constituintes com alegação funcional, neste caso específico a soja, e produção de metabólitos diferenciados no caso do probiótico, além da quantidade ministrada desses constituintes e modelo animal.

É o caso de Rossi et al. (2003), que ao avaliarem o efeito da ingestão de um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* sobre os níveis de lípídeos séricos de indivíduos normocolesterolêmicos, observou a manutenção do colesterol total e LDL, além da elevação do HDL, evidenciando que o produto pode conferir um “fator de proteção” a doenças ateroscleróticas.

Estudos (ESTEVES; MONTEIRO, 2001) em animais demonstraram que as isoflavonas não só interferem na concentração das lipoproteínas LDL e HDL como também protegem contra o desenvolvimento de placas de ateroma. Um possível efeito neste estudo pode ser atribuído à concentração de colesterol utilizada (0,2%) e sua deposição no fígado dos animais. Supõe-se que sejam necessárias concentrações menores e uma quantidade maior de produto contendo probiótico, o que condiz com o estudo patológico dos animais ao final do período experimental.

Hamsters são conhecidos por terem respostas similares aos humanos quanto a influências dietéticas na concentração sanguínea de lipídeos. A redução de lipídeos pela ingestão de produtos contendo proteína de soja pode ser resultado de inúmeros fatores, incluindo a proteína, além de componentes minoritários não protéicos como isoflavonas e saponinas, conforme observado por BALMIR et al. (1996).

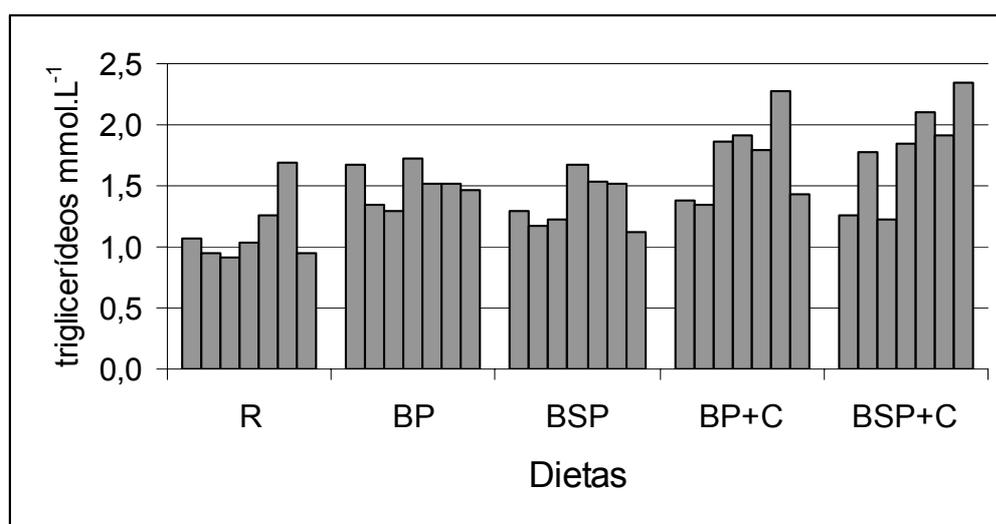


Figura 5.4. Concentração de triglicerídeos no plasma de hamsters alimentados com dietas experimentais ao final de 90 dias.

Dietas: R = dieta biotério (ração padrão); BP = bebida probiótica (ração padrão + 5mL bebida); BSP = bebida sem probiótico (ração padrão + 5mL bebida); BP+C = BP acrescido de 0,2% de colesterol; BSP+C = BSP acrescido de 0,2% de colesterol.

Freitas (2000), avaliando a funcionalidade de suco misto de cenoura e laranja adicionado de frutooligossacarídeos (FOS), em ensaio biológico com hamster, observou redução de 25% no nível de colesterol dos animais, com dieta contendo 15% de FOS, em relação ao grupo controle. Observou que animais com dieta contendo 0,5% de colesterol, ao final de 28 dias, apresentaram $223,5\text{mg.dL}^{-1}$ ($5,81\text{mmol.L}^{-1}$) de colesterol sanguíneo. Rossi et al. (2003) avaliaram o efeito da ingestão diária de 200mL de um fermentado soja contendo *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* sobre os níveis de lipídeos séricos de indivíduos normocolesterolêmicos, com um inóculo de 1,5% (v/v) dos cultivos *E. faecium* CRL 183 e 1,5% (v/v) de cultivo de *L. jugurti* 416, com 10^8UFC.mL^{-1} , observou que o nível de colesterol total e de triglicerídeos permaneceu inalterado durante todo o período de estudo, sem efeito do produto fermentado.

As respostas observadas neste estudo não são passíveis de explicação com base nos estudos precedentes, principalmente pelo fato do efeito hipocolesterolêmico não ter sido observado de forma explícita, mas sim indiretamente pelo não aumento do colesterol sérico total nos grupos com dietas BP e BSP em relação à dieta biotério (R). O mecanismo proposto possível seria a desconjugação de sais biliares pelos microrganismos do produto, condição que ocasionaria uma diminuição na absorção do colesterol exógeno, conforme mencionado na literatura (ROSSI et al., 2003; AMORES et al., 2003; SAAD, 2006). Por outro lado, as isoflavonas presentes na soja desempenham função importante na redução do colesterol, podendo essa resposta ser atribuída às mesmas de forma parcial, uma vez que o mesmo comportamento foi observado no grupo com dieta contendo probiótico (BP) e naquela sem o probiótico (BSP).

A média da concentração de glicose sanguínea não diferiu entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$). Por outro lado, em valores numéricos, a menor concentração foi observada no grupo que recebeu dieta sem probiótico (BSP) o que sugere um possível efeito dos oligossacarídeos da bebida. Segundo Sgarbieri e Pacheco (1999) polissacarídeos tendem a formar uma camada viscosa de proteção à mucosa do estômago e intestino delgado, dificultando a absorção de açúcares, desta forma reduzindo ou mantendo a glicemia.

3.3 Alterações histopatológicas em hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica

A deposição em excesso dos lipídeos em tecido extra-adiposo impede o metabolismo celular normal, além de comprometer a viabilidade celular. A esteatose hepática, referida como doença do fígado gorduroso não alcoólico, é o resultado do dano induzido pelos ácidos graxos. Esse termo engloba desde um simples acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos à esteatose hepática com inflamação, fibrose e cirrose (FROTA, 2007).

Nas amostras de fígado dos animais com dietas biotério (R), bebida probiótica (BP) e bebida sem probiótico (BSP) foram observadas apenas esteatose hepática eventual. Esta evidência histopatológica pode ser decorrente de estresse

ou diminuição de ingesta e/ou jejum, porém são ocorrências casuais nos fígados de roedores nascidos em biotério (JUBB; KENNEDY; PALMER, 2003).

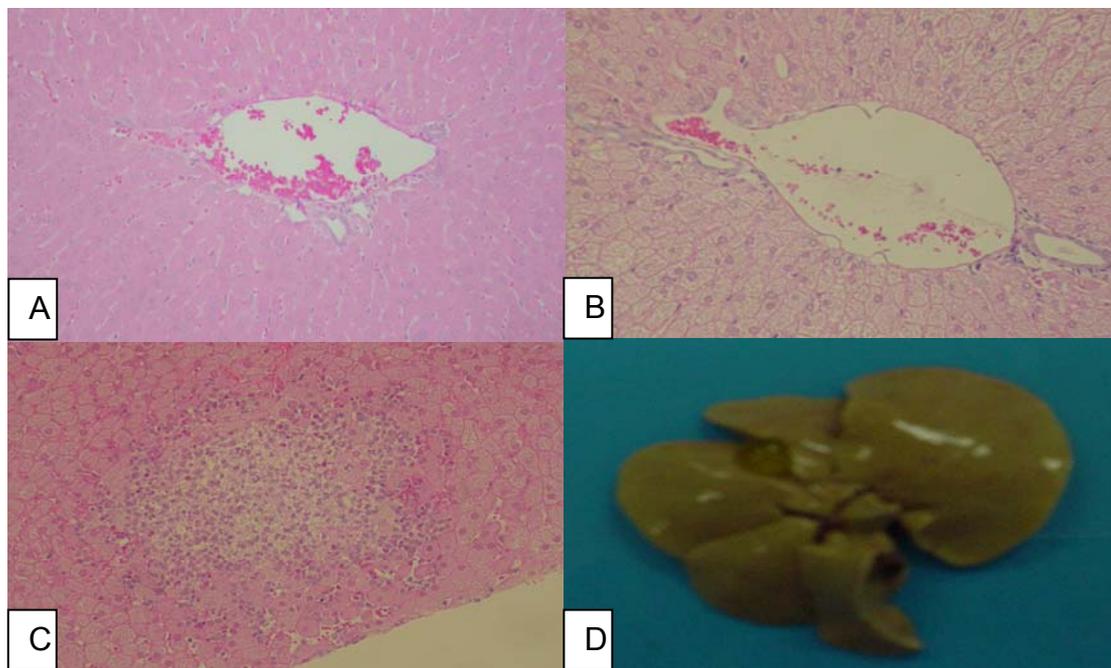


Figura 5.5. Fotomicrografia de secções do fígado de hamsters alimentados com dietas experimentais, ao final de 90 dias, em aumento de 20X (A) grupo dieta biotério (R), fígado normal, espaço porta; (B) grupo dieta BP+C, esteatose hepática, espaço porta; (C) grupo com dieta BSP+C, esteatose hepática difusa com foco de necrose; (D) grupo BSP+C, esteatose hepática, alteração da cor. Dietas: R = dieta biotério (ração padrão); BP = bebida probiótica (ração padrão + 5mL bebida); BSP = bebida sem probiótico (ração padrão + 5mL bebida); BP+C = BP acrescido de 0,2% de colesterol; BSP+C = BSP acrescido de 0,2% de colesterol.

Os grupos com dietas hipercolesterolêmicas (BP+C; BSP+C) apresentaram esteatose com focos de necrose (Figura 5), causada pelo aporte excessivo de ácidos graxos ao fígado, em virtude da ingestão de dieta com elevado nível de colesterol. As lesões detectadas nos animais foram muito graves e, segundo o estudo patológico, o elevado grau de agressão pode ter mascarado o provável efeito redutor de absorção promovido pelo probiótico administrado com a dieta (BP+C).

Nos rins, encéfalo e coração dos animais não foram detectadas alterações marcantes, apenas eventuais vacúolos no epitélio dos túbulos renais, que se constituem em ocorrência comum em hamsters (JUBB; KENNEDY; PALMER, 2003). Nos pulmões, eventualmente foi observada congestão dos capilares alveolares e

demais vasos pulmonares, provavelmente relacionadas com o colapso sistêmico induzido no momento da eutanásia (SLAUSON; COOPER, 2002).

Apesar da agressão devido às dietas hipercolesterolêmicas (BP+C; BSP+C), não foram detectadas alterações endoteliais ou presença de depósitos ateromatosos no coração. Estudos com animais demonstram a importância das isoflavonas aumentando a resposta de dilatação em artérias arterioscleróticas, além de atuarem como antioxidantes inibindo o processo trombótico, bloqueando a proliferação de células musculares lisas nas paredes das artérias, e evitando a formação de ateromas (ESTEVES; MONTEIRO, 2001). Essa evidência histopatológica necessita de maiores investigações, considerando que não houve redução no nível sérico de colesterol total do grupo com dieta probiótico em relação ao controle, e elevadas concentrações nos grupos hipercolesterolêmicos, apesar do colesterol não ser um fator isolado na formação de placas ateromatosas.

Nas amostras de intestino de todos os grupos experimentais os parâmetros avaliados estão dentro da normalidade. Não foi detectado aumento do infiltrado celular na mucosa ou no padrão secretório das células caliciformes os quais poderiam indicar um *status* reativo do intestino, especialmente no intestino grosso, levando a maior absorção devido à ingestão de probiótico.

Nos demais órgãos analisados (baço, pâncreas, adrenal, linfonodos e vesículas seminais) de alguns animais (n=10), pertencentes aos grupos submetidos às diferentes dietas, somente as vesículas seminais apresentaram cistos, considerados achados casuais, sem etiologia específica. Nos demais órgãos não foram encontradas alterações histopatológicas (JUBB; KENNEDY; PALMER, 2003).

3.4 Determinações microbiológicas nas fezes de hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica

A identidade da cultura nas fezes foi confirmada como *Lactobacillus acidophilus*. As colônias apresentaram-se gram-positivas e catalase-negativas, características básicas de lactobacilos, e com morfologia e perfil de fermentação característicos, de acordo com Bergey (1994) e Altermann et al. (2005).

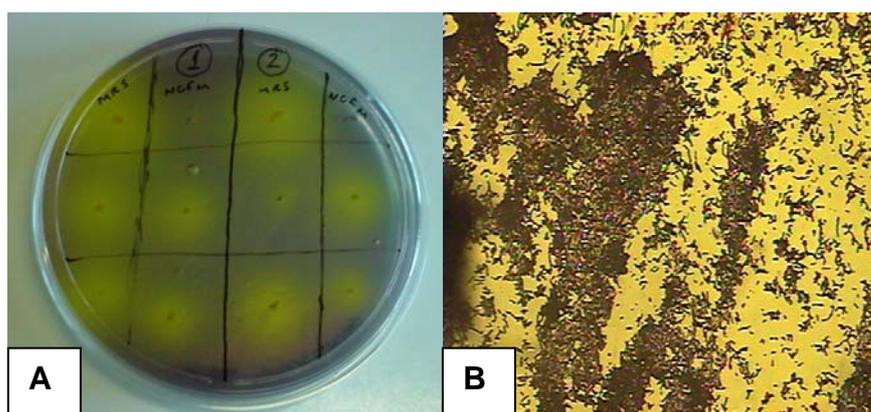


Figura 5.6. A) fermentação de açúcares B) coloração de Gram em colônias cultivadas em ágar MRS, provenientes das fezes de hamsters, identificadas como *Lactobacillus*.

A contagem de células viáveis nas fezes dos hamsters foi superior no grupo que recebeu a dieta sem probiótico (BSP) sem, no entanto, diferir do grupo que recebeu o probiótico (BP). Os outros grupos que receberam as dietas com colesterol (BP+C; BSP+C) e a dieta biotério (R) não diferiram entre si como pode ser evidenciado na Tabela 3.

Tabela 5.3. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus* ($\log\text{UFC.mL}^{-1}$) em fezes de hamsters submetidos a diferentes dietas, em intervalos de 15 dias, durante 90 dias

Períodos (dias)	Dietas ($\log\text{UFC.mL}^{-1}$)*				
	R	BP	BSP	BP+C	BSP+C
0	9,64	9,79	9,86	9,70	9,63
15	9,81	9,36	9,88	9,47	9,60
30	9,53	9,42	9,86	9,60	9,39
45	9,71	10,31	9,85	9,64	9,33
60	9,55	9,70	9,92	9,71	9,67
75	9,67	9,88	10,12	9,59	9,66
90	9,45	9,55	9,68	9,55	9,35
TOTAL	9,62 ^{bc}	9,72 ^{ab}	9,88 ^a	9,61 ^{bc}	9,52 ^c

Médias com letras distintas, na mesma linha, diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) * n = 7

Dietas: R = dieta biotério (ração padrão); BP = bebida probiótica (ração padrão + 5mL bebida); BSP = bebida sem probiótico (ração padrão + 5mL bebida); BP+C = BP acrescido de 0,2% de colesterol; BSP+C = BSP acrescido de 0,2% de colesterol.

Neste experimento as contagens de *Lactobacillus acidophilus* não foram influenciadas pelas diferentes dietas administradas, não sendo observada diferenças significativas entre os períodos de coleta e os tratamentos. As contagens mínima e máxima de *Lactobacillus* nas fezes dos hamsters, ao longo do período experimental (90 dias), foram de $9,33\log\text{UFC.mL}^{-1}$ e $10,31\log\text{UFC.mL}^{-1}$, respectivamente. Convém salientar que os animais do grupo BSP apresentaram maior contagem inicial (tempo 0) de *Lactobacillus* nas fezes, prevalecendo ao longo do período experimental. Já o grupo que recebeu probiótico apresentou a maior contagem de *Lactobacillus* nas fezes, porém esta só foi observada na avaliação aos 45 dias experimentais.

Santos et al. (2003) ao fornecerem durante 49 dias um “pool” de *Lactobacillus* sp. para leitões, avaliaram a contagem fecal de *Lactobacillus*, coliformes, *Clostridium* e *Enterococcus*. Não observaram interações entre os períodos de coleta e os tratamentos, entretanto obtiveram numericamente menor contagem de patógenos e proporcionalmente maior número de *Lactobacillus* nos animais do tratamento com probiótico, tendo atribuído este fato ao mecanismo de exclusão competitiva.

Algumas das possíveis causas de resultados irregulares obtidos com probióticos são listadas por Santos et al. (2003) que destacam o tipo de microrganismo utilizado, a viabilidade, as condições de armazenamento, a estabilidade durante o processamento do produto, além da presença de aditivos com caráter antagonista.

3.5 Determinação de lipídeos nas fezes dos hamsters após consumo de bebida fermentada probiótica

O colesterol exógeno, ou seja, proveniente da dieta, é metabolizado no fígado e o excesso é convertido em ácidos biliares que, via intestino (circulação entero-hepática), são lançados nas fezes, sendo parcialmente eliminados. Isto promove maior excreção lipídica nas fezes, que pode ser atribuída ao observado nas fezes dos animais (Tabela 5.4) que receberam dieta com colesterol (BP+C; BSP+C).

Tabela 5.4. Teor de lipídeos em fezes de hamsters submetidos a diferentes dietas, ao final de 90 dias

Dietas	Teor de lipídeos%
R	1,08 ^b ± 0,04
BP	1,22 ^b ± 0,05
BSP	1,15 ^b ± 0,06
BP+C	3,46 ^a ± 0,12
BSP+C	3,62 ^a ± 1,12

Médias (n=2) com letras distintas, na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan (p≤0,05).

Dietas: R = dieta biotério (ração padrão); BP = bebida probiótica (ração padrão + 5mL bebida); BSP = bebida sem probiótico (ração padrão + 5mL bebida); BP+C = BP acrescido de 0,2% de colesterol; BSP+C = BSP acrescido de 0,2% de colesterol.

Alguns probióticos como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* degradam os sais biliares e produzem ácidos graxos de cadeia curta, esta capacidade aumenta na presença de alguns prebióticos como manitol e frutooligossacarídeos (TARANTO et al.; 2000; RIVAS; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2006).

Frota (2007) menciona que em estudos realizados com hamsters e ratos há aumento da excreção de ácidos biliares devido à proteína de soja. Essa resposta não foi observada neste trabalho, apesar da maior excreção fecal de lipídeos, não tendo se observado diminuição na concentração sérica de colesterol. Os fatos observados poderiam ser melhor elucidados através de determinação complementar de colesterol bem como de sais biliares nas fezes dos animais ao final do período experimental.

4 Conclusões

A bebida de soja fermentada com o probiótico *Lactobacillus acidophilus* NCFM não influencia os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos de hamsters hipercolesterolêmicos, mas evita a formação de lesões ateromatosas cardíacas.

As dietas hipercolesterolêmicas resultaram em animais com esteatose hepática, peso do fígado aumentado e com menor coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

Animais com dieta sem probiótico (BSP) apresentam maior ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

As contagens de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* nas fezes dos animais não variam com a presença de probiótico na dieta.

CONCLUSÕES GERAIS

Em relação à adaptação do probiótico e elaboração da bebida fermentada verificou-se que o LA-NCFM apresenta potencial fermentativo em extrato de soja, não havendo necessidade da adição de sacarose para a obtenção de valores adequados de pH (próximo a 4,5), acidez, viscosidade aparente e número de células viáveis.

Em relação à qualidade sensorial verificou-se que a bebida fermentada com o microrganismo probiótico adicionada de sacarose na concentração de 12% (p/p) é a preferida pelos consumidores.

Em relação à viabilidade celular durante o armazenamento o produto mantém as suas características físico-químicas e prevalência de células viáveis (com índices acima do preconizado pela legislação vigente), durante 28 dias de armazenamento a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Em relação à funcionalidade a bebida elaborada com extrato de soja e LA-NCFM não influencia nos níveis séricos de colesterol total e triglicérides de hamsters hipercolesterolêmicos, contudo evidencia evitar a formação de lesões ateromatosas cardíacas. As dietas hipercolesterolêmicas resultam em animais com esteatose hepática, peso do fígado aumentado e com menor coeficiente de eficiência alimentar (CEA). As contagens de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* nas fezes dos animais, durante o período experimental, não são influenciadas pelas diferentes dietas administradas, não sendo observada diferenças significativas ($p\leq 0,05$) entre os períodos de coleta e os tratamentos observa-se, porém, prevalência de células de LA-NCFM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNielsen. **Estudo sobre informação nutricional e atitude do consumidor em relação a produtos saudáveis e orgânicos** (Novembro de 2005) Disponível em: <http://br.acnielsen.com/reports/documents/25268_1_Global_Nutrition_Research_port.pdf>. Acesso em 03 de março 2007.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos – produção e efeitos benéficos. **Boletim da SBCTA**, v. 35, n. 1/2, p. 12-19, 2001.

ALTERMANN, E.; RUSSEL, W. M.; AZCARATE-PERIL, M. A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B. L.; McAULIFFE, O.; SOUTHER, N.; DOBSON, A.; DUONG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings National Academy Science**, v. 102, n. 11, p. 3906-3912, 2005.

AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J. R.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, D. Probióticos. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 17, n. 2, p. 131-139, 2004.

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Composition changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 3S, p.581-588, 1995.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p.145-154, 2004.

ANZALDUA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994, 198p.

ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p.137-141, 1997.

ASHAYE, O. A.; TAIWO, L. B.; FASOYIRO, S. B.; AKINNAGBE, C. A. Compositional and shelf-life properties of soy-yogurt using two starter cultures. **Nutrition and Food Science**, v. 31, n. 5, p. 247-250, 2001.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analisis of the Association of Official Analytical Chemists.** 17 ed. Washington: Horwitz, H. 2003.

BALMIR, F.; STAACK, R.; JEFFREY, E.; JIMENEZ, M. D. B.; WANG, L.; POTTER, S. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 3046-3053, 1996.

BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.

BARRANGOU, R.; ALTERMANN, E.; HUTKINS, R.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T. R. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in frutooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings National Academy Science**, v. 100, n. 15, p. 8957-8962, 2003.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p.119-126, 2003.

BARRETO, G. M. P.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L. Comparação de meios de cultura para contagem de *Lactobacillus acidophilus* em alimentos probióticos. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 2, 2004, Florianópolis, SC. **Anais do...Florianópolis: UFSC, 2004, 1 CD-ROM.**

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1729-1738, 2006.

BEHNER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para a histologia normal e patológica.** São Paulo: EDART, 1976. 239p.

BERGEY, D. H. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology.** Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 9 ed., p. 565 - 570.

BERNAL, O. L. M. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos.** 2004. 103p. Tese. (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BERTEI, V. F.; FAGUNDES, R. L. M. Uso de isoflavona na menopausa: tratamento e prevenção da osteoporose. **Higiene alimentar**, v. 20, n. 142, p. 34-37, 2006.

BLAIR, R. M.; APPT, S. E.; BENNETAU-PELISSERO, C.; CLARKSON, T. B.; ANTHONY, M. S.; LAMOTHE, V.; POTTER, S. M. Dietary soy and soy isoflavones have gender-specific effects on plasma lipids and isoflavones in golden syrian F1B hybrid hamsters. **Journal of Nutrition**, v. 132, p.3585–3591, 2002.

BORRMANN, D.; YOSHIME, L. T.; CARVALHO, O. T.; BEHRENS, J. H. Avaliação sensorial de bebidas a base de extrato hidrossolúvel de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba, PR. **Anais do...** Curitiba: SBCTA, 2006, 1 CD-ROM.

BRASIL. ANVISA/ Ministério da Saúde. Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 jan. 2002, p. 191 - 192.

BROMBERG, R. Probióticos: conceitos e aplicações. **CTC-TecnoCarnes**, v. 13, n. 2, p. 6-7, 2003.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**. V. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005.

CANGANELLA, F.; GIONTELLA, D.; NESPICA, M. L.; MASSA, S.; TROVATELLI, L. D. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* in yogurts manufactured from cowmilk and soymilk during storage at two temperatures. **Annals of Microbiology**, v. 50, p. 43-53, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; CRANCIANINOV, W. S.; MANDARINO, J.M.G. Índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) e índice de dispersibilidade de proteína (IDP), em cultivares de soja produzidas em Londrina e Ponta Grossa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4, 2006, Londrina, PR. **Anais do...** Londrina: EMBRAPA, 2006, p. 297-299.

CHAVES, J. B. P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Ed. da UFV, 1993. 91p.

CHOU, C.; HOU, J. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 113-121, 2000.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p.920-929, 2006.

CUENCA, M. M.; QUICAZÁN, M. C. Comparación de la fermentación de bebida de soya e leche de vaca utilizando un cultivo láctico comercial. **Ingeniería y Competitividad**, v. 5; n.2; p. 16-22, 2004.

DRISKO, J. A.; GILES, C. K.; BISCHOFF, B. J. Probiotics in health maintenance and disease prevention. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 2, p.143-155, 2003.

EMBRAPA SOJA. Disponível em:<<http://www.cnpso.embrapa.br/>>. Acesso em 17 jan. 2007.

ESCALANTE, L. A. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 21, n. 3, p. 106-114, 2001.

ESTEVEZ, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 1, p.43-52, 2001.

FAVARO TRINDADE, C. S.; TERZI, S. C.; TRUGO, L. C.; DELLA MODESTA, R. C.; COURI, S. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 1, p.100-104, 2001.

FERREIRA, C. L. L. F. Bactérias do ácido láctico como fermentos funcionais. **Leite e derivados**, n. 86, p. 75-79, 2005.

FRANCO, G. **Tabela de composição de alimentos**. 7 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986, 145p.

FRANCO, R. C. **Análise comparativa de legislações referentes aos alimentos funcionais**. 2006. 167p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, FSF, FEA, FSP, São Paulo.

FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Probióticos: revisão. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 142, p. 22-33, 2006.

FREITAS, D. G. C. **Efeito da adição de pectina e frutooligossacarídeo como ingredientes funcionais no suco misto de cenoura e laranja**. 2000. 108p. Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.

FROTA, K. M. G. **Efeito do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e da proteína isolada no metabolismo lipídico em hamsters hipercolesterolemizados**. 2007. 136p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo.

FUCHS, R. H. B.; BORSATO, D.; BONA, E.; HAULY, M. C. O. Iogurte de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p.175-181, 2005.

GARRO, M. S.; VALDEZ, G. F.; OLIVER, G.; GIORI, G. S. Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p. 808-810, 1999.

GARRO, M. S.; VALDEZ, G. F.; GIORI, G. S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v. 21, p. 511–518, 2004.

GIBSON, G. R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, v. 130, supl., p.391-395, 2000.

GIBSON, G.R.; WILLIS, C.L.; LOO, J. V. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria – implications for health. **International Sugar Journal**, v. 96, n. 1150, p. 381–387, 1994.

GENOVESE, M. I.; Lajolo, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 86-93, 2001.

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 582-586, 2004.

GÓES-FAVONI, S. P. **Proteína texturizada com maior teor de isoflavonas agliconas obtida de cotilédones de soja após tratamento hidrotérmico**. 2007. 121p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia Alimentar**, n. 64, p. 12-22, 1999a.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p.139-157, 1999b.

GUEDES NETO, L. G.; PENNA, C. F. A. M.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R. *Lactobacillus acidophilus* e a indústria de laticínios. In: **Leite e derivados**, n.66, 2002. Disponível em: <<http://www.dipemar.com.br/leite>>. Acesso em: 19 dez. 2005

GUIMARÃES, O. Mais saúde no cardápio. **O Sulco**, n. 23, p.10-12, 2005.

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v. 52, n. 11, p. 62-69, 1998.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, suppl., p. 374-379, 2001.

HOU, J.; YU, R.; CHOU, C. Changes in some components of soymilk during fermentation with *Bifidobacteria*. **Food Research International**, v. 33, p. 393-397, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. v. 1. São Paulo: O Instituto, 1985. 533p.

JONES, P. J. Functional foods — more than just nutrition. **Canadian Medical Association Journal**, v. 166, n. 12, p. 1555- 1563, 2002.

JUBB, K.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4 ed. v. 1. Orlando: Academic Press, 2003. 657p.

KAMALY, K. M. *Bifidobacteria* fermentation of soybean milk. **Food Research International**, v. 30, n. 9, p.675-682, 1997.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2682-2684, 2000.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1999. 532p.

LÓPEZ, R. Apelo saudável potencializa mercado de bebidas à base de soja. **Engarrafador moderno**, n. 111, p.18-22, 2003.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as a probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1, p.1-17, 2001.

LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUSA, N. L. MERUSSE, J. L. B.; NEVES, S. P. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2 ed. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259p.

MA, A. T. M. H.; DE FRANCISCO, A.; RAGUZZON, J.C.; HELM, C. V. Composição química de farinha de soja integral: a influência do processamento térmico e da retirada da casca do grão. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 2, 2004, Florianópolis, SC. **Anais do...Florianópolis: UFSC, 2004, 1 CD-ROM**.

MACHADO, D. F.; FERREIRA, C. L. L. F.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, T. T. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 270-275, 2003.

MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; CRANCIANINOV, W. S. Teor de isoflavonas em cultivares de soja da EMBRAPA-SOJA. . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4, 2006, Londrina, PR. **Anais do...Londrina: EMBRAPA, 2006, p. 294-296**.

MARFO, E. K.; SIMPSON, B. K.; IDOWU, J. S.; OKE, O. L. Effect of local processing on phytate levels in cassava, coyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1580-1583, 1990.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges or future probiotic foods. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.

MAZZA, G. **Alimentos funcionales** - aspectos bioquímicos y de procesado. Zaragoza: Acribia, 1998. 457p.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1991, 354p.

MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. D. R. **The simple soybean and your health**. New York: Avery publishing Group, 1994. 260p.

MITSUOKA, T. **Intestinal bacteria and health**: an introductory narrative. Japão: Harcourt Brace Jovanovich Japan, 1978. 208p.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L.; COSTA, F. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Escolha da doçura e sabor ideal de um alimento fermentado de soja. . In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 6, 2005, Campinas. **Anais do...** Campinas: SLACA, 2005, 1 CD-ROM.

MORAES, M. A. C. **Métodos para a avaliação sensorial dos alimentos**. 8 ed. Campinas: ed. da UNICAMP, 1993. 93p.

MORAES, R. M. de **Montagem e avaliação de um equipamento para desodorização de “leite de soja” por arraste de vapor superaquecido**. 2002. 51p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja**: suas aplicações. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1996. 259p.

MOREIRA, L. B. G.; RODRIGUEZ, C. L.; CORDEIRO, C.; SERRA, E. F.; TECHY, L. L.; BUSNARDO, R. logurte de soja enriquecido com vitaminas e minerais para consumo de indivíduos com intolerância a lactose. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 6, 2005, Campinas. **Anais do...** Campinas: SLACA, 2005, 1 CD-ROM.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 13-126, 1999.

NAVARRO, V.; MACARULLA, M. T.; CHÁVARRI, M.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ, V. M.; PUY-PORTILLO, M. El ácido linoleico conjugado disminuye la hipercolesterolemia pero aumenta el riesgo de litiasis biliar. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, n. 3, p. 223-228, 2005.

NEVES, E. G. F.; SOARES, C. F.; GOMES, J. C. Análise de aceitação de uma bebida a base de proteína de soja pasteurizada. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 6, 2005, Campinas. **Anais do...** Campinas: SLACA, 2005, CD-ROM.

NISTOR, A.; BULLA, A.; FILIP, D. A.; RADU, A. The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 68, p. 159-173, 1987.

NTANIOS, F. Y.; JONES, P. J. H. Dietary sitostanol reciprocally influences cholesterol absorption and biosynthesis in hamsters and rabbits. **Atherosclerosis**, v. 143, p. 341-351, 1999.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (suplemento), p.172-176, 2003.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I. REMEUF, F. CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 935-942, 2001.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science: food microbiology and safety**, v. 67, n. 6, p. 2336-2341, 2002.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. **Alimentos funcionais**. Campinas: ITAL, 69p. 1999.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 251-260, 2004.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 200-206, 1997.

PARRA, C. D. Guia do engarrafador 2007: empresas criam diferenciais que garantem seu próprio mercado. **Engarrafador Moderno**, p. 6 -12, 2007.

PENNA, A. L. B. Probióticos e saúde. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2002. 1 CD-ROM.

PENNA, F. J. FILHO, L. A. P.; CALÇADO, A. C.; JÚNIOR, H. R.; NICOLI, J. R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 2S, p. 209-217, 2000.

PEREIRA, A. C. Proteínas de soja e o uso na indústria de alimentos. In: Seminário novas alternativas de mercado: **Alimentos funcionais e biotecnologia**. 2002, Campinas, p.147- 163.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 95p.

PRATES, J. A. M.; MATEUS, C. M. R. P. Componentes com actividade fisiológica dos alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 541, p. 3-12, 2002.

PUPIN, A. M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: Seminário novas alternativas de mercado. **Alimentos funcionais e biotecnologia**. 2002, Campinas, p. 133-145.

QUICAZÁN, M. C.; SANDOVAL, A.; PADILLA, G. Evaluación de la fermentación de bebida de soya con un cultivo láctico. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 3, n. 2, p. 92-99, 2001.

REDDY, P. V.; MITAL, B. K. Physical and chemical characteristics of soy milk. **Journal of Food Science and Technology**, v.29, n.3, p.193-194. 1992.

RIVAS, F. G.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B. E. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. **Revista Salud Pública y Nutrición, RESPYN**, v. 7, n.1, 2006.

RODAS, M. A. B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L. Z.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 304-309, 2001.

RODRIGUES, R. da S. **Caracterização de extratos de soja obtidos de grãos, farinha integral e isolado protéico visando a formulação e avaliação biológica (em coelhos) de bebida funcional à base de extrato de soja e polpa de pêssegos**. 2003. 177p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.

RODRÍGUEZ, M. B. S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. Functional foods and optimum nutrition: A way or away? **Revista Española de Salud Pública**, v. 77, n. 3, p. 317-331, 2003.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; CARLOS, I. Z.; UEIJI, I. S.; SQUINZARI, M. M.; SILVA, S. I.; VALDEZ, G. F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de coelhos hipercolesterolémicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 74, n. 3, p. 209-212, 2000.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; CARLOS, I. Z.; OLIVEIRA, M. G.; VALDEZ, G. F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolémicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.53, n. 1, p. 47-51, 2003.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 01, p.1-16, 2006.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 319-331, 2001.

SANTOS, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; GOMES, P.C.; SANTOS, J. L.; POZZA, P. C.; TESHIMA, E. Influência do fornecimento de probiótico a base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p.1395-1400, 2003.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, n. 1/2, p7-19, 1999.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894 – 907, 2000.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, v. 55, n. 11, p. 46-53, 2001.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; BRITZ; M. L. ; KYLE, W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**. v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 411-417, 1999.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; SESMA, F.; GIORI, G. S.; PIARD, J-C. Characterization of the *melA* locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p.5464-5471, 2002.

SLAUSON, D. O.; COOPER, B. J. **Mechanisms of Disease**. 3ed. Mosby, 2002, 445p.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. (Coordenadores). IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, supl. 1, p. 2-19, 2007.

STATISTICA for Windows – Release 6.0 A. Tulsa: Statsoft Inc., 2001.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 2 ed. London: Academic Press, 1993. 337 p.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. Fermented milks and their trends. Part II. Technological aspects. **Journal of Dairy Research**. v. 55, s/n., p. 281-307. 1988.

TAMIME, A. Y.; MARSHALL; V. M. E.; ROBINSON, R. K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p.151-187, 1995.

TARANTO, M. P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; RUIZ HOLGADO, A. P.; VALDEZ, G. F. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. **Journal Dairy Science**, v. 81, n.9, p.2330-2340, 1998.

TARANTO, M. P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; RUIZ HOLGADO, A. P.; VALDEZ, G. F. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. **Journal Dairy Science**, v. 83, n.3, p. 401-403, 2000.

TÁRRAGA, A. C.; CLAESSEON, M. J.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N. R. GI genomes. **Nature Reviews**, v.3, p.368-369, 2005.

TASHIMA, E. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja (*Glicine Max L. Merrill*) comercial adoçado com sacarose e com sucralose. **Boletim do CEPPA**, v. 21, n. 2, p. 409-428, 2003.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, p. 393-400, 2005.

THAMER, K. G., PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TODA, T.; SAKAMOTO, A.; TAKAYANAGI, T.; YOKOTSUKA, K. Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. **Food Science and Technology Research**, v. 6, n. 4, p.314-319, 2000.

TOMELIN, B.; PEPLAU, P. *Lactobacillus*: características, processos de fermentação e seus produtos. In: **Leite e derivados**, n. 84, 2005. Disponível em: <<http://www.dipemar.com.br/leite>> Acesso em: 19 dez. 2005.

UMBELINO, D. C.; ROSSI, E. A.; CARDELLO, H. M. A. B.; LEPERA, J. S. Aspectos tecnológicos e sensoriais do "iogurte" de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 276-280, 2001.

VALIM, M. F.; ROSSI, E. A.; SILVA, R. S. F.; BORSATO, D. Sensory acceptance of a functional beverage based on orange juice and soymilk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 153-156, 2003.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, p.97-102, 2000.

WANG, S. H.; ASCHERI, J. L. R. Iogurte de soja: fermentação láctica e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 11, n. 2, p. 212- 238, 1991.

WANG, S.H.; MARINHO, C. S.; CARVALHO, E. P. Produção de iogurte de soja com diferentes associações de bactérias lácticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 10, p. 1539-1601, 1994.

WANG, H-J.; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2377-2383, 1996.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. **Food Microbiology**, v. 19, p. 501-508, 2002.

WILLE, G. M. F. C.; PEDROZO, M.; FREITAS, R.J.S. Determinação do fator antitriptico, índice de solubilidade de nitrogênio, uréase e proteína de cultivares de soja (*Glycine max. (L.) Merr.*). In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 2, 2004, Florianópolis, SC. **Anais do...** Florianópolis: UFSC, 2004, 1 CD-ROM.

ZACARCHENCO, P. B. **Leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*: isolamento diferencial dos microrganismos, multiplicação em diferentes condições e efeitos nas características sensoriais dos leites fermentados naturais ou modificados**. 2003. 181p. Tese. (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ZHOU, J. R. Soy and the prevention of lifestyle-related diseases. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, p. 14-19S, 2004.