

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

MICHELE CRISTINA VIEIRA

PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA À BASE DE  
EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA ADICIONADA DE  
POLPA DE MACAUBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex  
Mart.) UTILIZANDO CULTURA LÁCTEA TRADICIONAL DO  
IOGURTE E LINHAGEM PROBIÓTICA

Belo Horizonte  
2017

MICHELE CRISTINA VIEIRA

PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA À BASE DE  
EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA ADICIONADA DE  
POLPA DE MACAUBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex  
Mart.) UTILIZANDO CULTURA LÁCTEA TRADICIONAL DO  
IOGURTE E LINHAGEM PROBIÓTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Inayara Cristina Alves Lacerda

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Raquel Linhares Bello de Araújo

Colaboradora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Luciana Rodrigues da Cunha

Belo Horizonte, MG  
2017

V658p

Vieira, Michele Cristina.

Produção de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionada de polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) utilizando cultura láctea tradicional do iogurte e linhagem probiótica / Michele Cristina Vieira. – 2017.

127 f. : il.

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.

Coorientadora: Raquel Linhares Bello de Araújo.

Colaboradora: Luciana Rodrigues da Cunha

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Alimentos funcionais - Teses. 2. Fermentação – Teses. 3. Extrato hidrossolúvel de soja. 4. Cultura láctea – Teses. 5. Probióticos - Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Araújo, Raquel Linhares Bello de. III. Cunha, Luciana Rodrigues da. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA MICHELE CRISTINA VIEIRA

Realizou-se, no dia 30 de novembro de 2017, às 10h30min na sala 3061, Bloco 3, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada: **Produção de bebida fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja adicionada de polpa de macauba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) utilizando cultura láctea tradicional de iogurte e cepa probiótica**, apresentada por MICHELE CRISTINA VIEIRA, número de registro 2015711869, graduada no curso de CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LATICÍNIOS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo (Coorientadora e Presidenta da Comissão) da Faculdade de Farmácia UFMG, Profa. Dra. Denise Sande Santos da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas e Profa. Dra. Maria Emília Rabelo Andrade, Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia - UFMG.

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 30 de novembro de 2017.

Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo (Coorientadora e Presidente da Comissão)

Profa. Dra. Denise Sande Santos

Profa. Dra. Maria Emília Rabelo Andrade

*Aos meu amados pais,  
Enilson e Marlene; as  
minhas irmãs, Ju e Etinha e  
ao meu amigo e  
companheiro Juliano, dedico  
este trabalho, pelo  
extraordinário amor e  
carinho infinitamente  
recebidos*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado a vida e aos meus maiores tesouros, Enilson e Marlene, agradeço por tudo que me ensinaram, incentivaram e apoiaram nessa caminhada que nem sempre foi fácil e prazerosa. Obrigada por todo amor e carinho desde sempre. Vocês são os maiores responsáveis por tudo que conquistei. Amo vocês!

As minhas irmãs e amigas, Ju e Etinha, por fazerem dos meus dias mais alegres, cheios de vida e festa! Não poderia ter irmãs mais especiais que vocês.

A você Juju, por todo amor, compreensão, companheirismo, amizade e paciência. Obrigada pelos dias bons, pelas conversas, pelos abraços e pelas cervejas. Obrigada por ser sempre a minha Primavera, mesmo depois dos dias ruins e cinzentos. A minha vitória também é sua!

Aos meus filhos peludos: Bebel, Amora, Kika, Dafne, Fumaça e a chata da Marry, por fazerem meu coração mais alegre, meu bolso mais vazio e minha vida muito mais feliz.

À Ina, minha orientadora maravilhosa, muito obrigada por todo ensinamento, disponibilidade e paciência. À Raquel, minha co-orientadora não menos maravilhosa, agradeço igualmente por tudo. A confiança de vocês me fez acreditar no meu potencial.

As minhas queridas colaboradoras, Lu e Paty, agradeço imensamente por toda ajuda e apoio.

A minha querida amiga Lu Faleiro, pela infinita boa vontade! Você é parte fundamental nessa conquista e muito especial para mim.

As “Gatinhas da Enut” por fazerem dos meus dias infinitamente mais divertidos. Milis, Elisa, Taty, Marcelita e Jaque: Preparem-se, as costelinhas nos esperam!

A todos os professores do Departamento de Alimentos da Escola de Nutrição da UFOP, em especial a Prof. Camila e Prof. Kelly, pelas contribuições, doações e ajuda durante todo experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela oportunidade, ao CNPQ/Fapemig e a UFOP pelo apoio financeiro.

Aos mais lindos TA's da UFOP, em especial à Bruxeza, muito obrigada pelas risadas, pelas raivas e pelo nosso tour gastronômico rico da primeira semana. Não tenho palavras para agradecer o quanto vocês fazem dos meus dias mais alegres.

Às maravilhosas Elaine, Ronália e Lud, muito obrigada pelo apoio, conversas, risadas e puxões de orelha.

Aos queridos Mauro, Flavinha e Bárbara, meus sinceros agradecimentos por aguentarem minha perturbação diária e insistente. Obrigada pelos ensinamento, disposição e boa vontade.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram nessa caminhada e também aos que atrapalharam,

Muito obrigada!

*“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.*

Dalai Lama

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo desenvolver bebidas fermentadas à base de extrato hidrossolúvel de soja (EHS) adicionada de polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) utilizando cultura láctea tradicional do iogurte e linhagem probiótica de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5). A polpa de macaúba foi caracterizada em relação à composição química, teor de carotenoides e compostos fenólicos totais. A capacidade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. A qualidade microbiológica foi determinada conforme recomendações da ANVISA. Na produção das bebidas fermentadas foram usadas cultura tradicional de iogurte composta pelas espécies *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* e uma linhagem probiótica de *L. acidophilus* na forma pura e associada com a cultura de iogurte. No total, foram produzidas três formulações base da bebida fermentada à base de EHS e cada uma destas divididas em adicionadas e não adicionadas de polpa de macaúba. Após o processamento e envase, as bebidas fermentadas à base de EHS com e sem adição de polpa de macaúba foram armazenadas por 28 dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  e avaliadas em relação a composição centesimal e monitoradas semanalmente (0, 7°, 14°, 21° e 28° dia) em relação ao pH, acidez e viabilidade celular. Os resultados mostraram que a polpa de macaúba possui valores adequados de fibra alimentar, proteínas, lipídeos, carotenoides e compostos fenólicos. A capacidade antioxidante avaliada na macaúba foi em torno de 7310,76 g fruta/g DPPH, 6,27  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta e 7,57  $\mu\text{M}$  Sulfato Ferroso/g fruta para os métodos DPPH, ABTS e FRAP respectivamente. A incorporação da polpa de macaúba à bebida fermentada à base de EHS aumentou os teores de todos os nutrientes, sendo a fibra alimentar o componente com maior efeito significativo. O monitoramento durante o armazenamento refrigerado ( $7^\circ\text{C}$ ) demonstrou que as bebidas fermentadas pela cultura tradicional de iogurte, adicionadas e não adicionadas de polpa de macaúba, manteve contagens de células viáveis em torno de 7 log UFC/mL durante todo período avaliado com valores máximos de pH e acidez de 4,52 e 0,34 % respectivamente. Nas bebidas fermentadas por *L. acidophilus*, os resultados demonstraram que a viabilidade do probiótico sofreu declínio de 3 ciclos log na bebida sem adição de polpa e 2 ciclos na bebida adicionada, com contagens finais em torno de 4 log UFC/mL. Os valores de acidez e pH foram de 0,33 % e 4,47 (bebida sem adição de polpa) e 0,34 % e 4,52 (bebidas com adição de polpa) respectivamente. Nas bebidas fermentadas onde o *L. acidophilus* foi adicionado junto com a cultura tradicional de iogurte, a viabilidade em ambas as bebidas com e sem polpa sofreu redução alcançando valores finais em torno de 3 log de UFC/mL. Os valores de pH e acidez mantiveram-se constante em ambas, atingindo valores finais de 4,61 para o pH e 0,34% de acidez. Como conclusão sugere-se que a utilização da polpa de macaúba pode contribuir no enriquecimento nutricional de todas as bebidas, principalmente um acréscimo de fibra alimentar. As duas culturas lácteas utilizadas fermentaram o EHS, e a cultura tradicional de iogurte apresentou maior velocidade de fermentação e manutenção das células viáveis durante 28 dias, sendo o efeito probiótico observado até o 7° dia no produto final.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. Fermentação. EHS. Culturas lácteas. Probióticos.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to develop fermented beverages based on water soluble soybean extract (EHS) with macaúba pulp (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.) using traditional yoghurt milk culture and probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* (LA-5). The macaúba pulp was characterized by the chemical composition, carotenoid content and total phenolic compounds. The antioxidant capacity in vitro was evaluated by the ABTS, DPPH and FRAP methods. Microbiological quality was determined according to ANVISA recommendations. In the production of fermented beverages, a traditional yoghurt culture composed of the species *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* and a probiotic *L. acidophilus* strain in the pure form and associated with the yogurt culture were used. In total, three base formulations of the EHS-based fermented beverage were produced and each of these divided into added and not added macauba pulp. After processing and packaging, EHS-based fermented beverages with and without macaúba pulp were stored for 28 days at  $7 \pm 1$  ° C and evaluated for centesimal composition and monitored weekly (0, 7, 14, 21 ° and 28 ° day) in relation to pH, acidity and cell viability. The results showed that the macaúba pulp has adequate values of dietary fiber, proteins, lipids, carotenoids and phenolic compounds. The antioxidant capacity evaluated in the macaúba was around 7310.76 g fruit / g DPPH, 6.27 µM trolox / g fruit and 7.57 µM Ferrous Sulfate / g fruit for the DPPH, ABTS and FRAP methods respectively. The incorporation of macaúba pulp into the EHS-based fermented beverage increased the levels of all nutrients, with dietary fiber being the most significant component. Monitoring during refrigerated storage (7 ° C) showed that beverages fermented by traditional yogurt culture, added and not added to macauba pulp, maintained viable cell counts of about 7 log CFU / mL throughout the period evaluated with values maximum pH and acidity of 4.52 and 0.34%, respectively. In the *L. acidophilus* fermented beverages, the results demonstrated that probiotic viability declined 3 log cycles in the beverage without addition of pulp and 2 cycles in the added beverage, with final counts around 4 log CFU / mL. The values of acidity and pH were 0.33% and 4.47 (beverage without addition of pulp) and 0.34% and 4.52 (beverages with addition of pulp), respectively. In the fermented beverages where *L. acidophilus* was added along with the traditional yoghurt culture, the viability in both beverages with and without pulp decreased to reach 3 log CFU / mL. The values of pH and acidity remained constant in both, reaching final values of 4.61 for pH and 0.34% of acidity. As conclusion it is suggested that the use of macaúba pulp may contribute to the nutritional enrichment of all beverages, especially an increase of dietary fiber. The two dairy cultures used to ferment EHS, and the traditional yoghurt culture showed a higher fermentation rate and maintenance of the viable cells for 28 days, and the probiotic effect was observed until the 7th day in the final product.

Key words: Functional foods. Fermentation. EHS. Dairy cultures. Probiotics

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Compostos com alegação de propriedades funcionais atualizados pela Anvisa.....	30
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeitos relacionados ao consumo de probióticos.....	34
Figura 2 – Estrutura do estradiol e isoflavona.....	38
Figura 3 – Estrutura química dos carotenoides .....	44
Figura 4 – Cerrado Brasileiro.....	46
Figura 5 – Palmeira macaúba (A) e aspectos dos frutos (B) durante desenvolvimento.....	47
Figura 6 – Macaúba e suas partes.....	47
Figura 7 – Processamento simplificado das amostras de Macaúba.....	51
Figura 8 – Fluxograma de processamento das bebidas.....	60
Figura 9 – Variação do pH em função do tempo durante fermentação das bebidas por inóculos de <i>L. acidophilus</i> (LA5), cultura mista tradicional para iogurte (YF-L812) e a mistura de ambas (LA5+YF-L812) .....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química média da polpa e amêndoa de macaúba.....	49
Tabela 1 – Microrganismos presentes nas culturas utilizadas e codificação adotada para cada tipo de bebida.....	61
Tabela 2 – Rendimento obtido na obtenção de polpa de macaúba.....	65
Tabela 3 – Composição centesimal (g/100 g) das polpas de macaúba.....	66
Tabela 4 – Carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ ) e Compostos fenólicos totais (mg GAE/100g) das polpas de macaúba.....	69
Tabela 5 – Capacidade antioxidante in vitro.....	72
Tabela 6 – Análise microbiológica da polpa de macaúba.....	74
Tabela 7 – Contagem de células viáveis nas culturas liofilizadas.....	77
Tabela 8 – Viabilidade dos inóculos de trabalho ao longo do armazenamento congelado.....	78
Tabela 9 – Acidez (% ácido láctico) no início e final da fermentação.....	79
Tabela 10 – Composição centesimal das bebidas fermentadas.....	82
Tabela 11 – Análise microbiológica das bebidas fermentadas.....	87
Tabela 12 – Valores de pH das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	88
Tabela 13 – Valores de acidez (% ácido láctico) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	90
Tabela 14 – Valores da viabilidade celular ( $\log \text{UFC/mL}$ ) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	92
Tabela 15 – Valores de pH das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	94

Tabela 16 – Valores de acidez (% ácido láctico) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	95
Tabela 17 – Valores da viabilidade celular (log UFC/mL) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	96
Tabela 18 – Comparativo entre as bebidas em relação aos atributos avaliados.....	99

## LISTA DE SIGLAS

ABTS - 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

CAT – Catalase

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONAB- Companhia Brasileira de Abastecimento

CTCAF – Conselho de Assessoramento Técnico Científico

DEALI/ENUT/UFOP – Departamento de Alimentos/ Escola de Nutrição/  
Universidade Federal de Ouro Preto

DEX/ UFLA – Departamento de Exatas/Universidade Federal de Lavras

DHA - Ácido docosaexanoico

DNCT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DVS – Direct Vat Set

E.coli - Escherichia coli

EHS - Extrato Hidrossolúvel de Soja

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA – ácido eicosapentanoico

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FAFAR – Faculdade de Farmácia

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations

FDA – Food and Drug Administration

FOS – Frutooligossacarídeo

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

IN – Instrução Normativa

GAE – Galic Acid Equivalent

GSH -Glutathione

GPx - Glutathione peroxidase

HPLC - High performance liquid chromatography

Kcal – quilocalorias

LAB – Latic Acid Bacteries

LA-5 – *Lactobacillus acidophilus* linhagem LA5

L. - *Lactobacillus*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRS - Man, Rogosa and Sharpe

MS - Ministério da Saúde

NMP - Número mais provável

P.A – Padrão Analítico

PPGCA-Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

RDC – Resolução Diretoria Colegiada

SOD – Superoxide Dismutase

subsp. - Subespécie

TGI - Trato gastrointestinal

UFC - Unidade formadora de colônia

UV- Ultravioleta

WHO - World Health Organization

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	21
2.	OBJETIVOS .....	25
2.1.	Objetivo geral .....	25
2.2.	Objetivos específicos .....	25
3.	REVISÃO DE LITERATURA .....	26
3.1.	Alimentos Funcionais .....	26
3.1.1.	Panorama Brasileiro dos Alimentos Funcionais .....	28
3.2.	Probióticos .....	33
3.3.	Soja .....	36
3.3.1.	Potencial funcional da soja .....	37
3.3.2.	Extrato Hidrossolúvel de soja .....	39
3.4.	Macaúba .....	41
3.5.	Compostos Bioativos .....	46
3.5.1.	Antioxidantes .....	47
3.5.2.	Carotenoides .....	48
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	51
4.1.	Material .....	51
4.1.1.	Matérias-primas .....	51
4.1.2.	Culturas microbianas liofilizadas .....	51
4.2.	Métodos .....	51
4.2.1.	Obtenção da polpa de macaúba <i>in natura</i> .....	51
4.2.2.	Análises físico-químicas da polpa de macaúba .....	53
4.2.2.1.	Composição Centesimal da Polpa .....	53
4.2.2.2.	Determinação de carotenoides totais na polpa de macaúba .....	53
4.2.3.	Determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i> na polpa de macaúba .....	54
4.2.3.1.	Obtenção dos extratos .....	54
4.2.3.2.	Determinação dos compostos fenólicos totais .....	55
4.2.3.3.	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> .....	55
4.2.3.3.1.	Método de captura de radicais DPPH .....	55
4.2.3.3.2.	Método de captura de radicais ABTS .....	56
4.2.3.3.3.	Método FRAP .....	57
4.2.4.	Análises microbiológicas da polpa de macaúba .....	57
4.2.5.	Padronização e obtenção do inóculo para elaboração das bebidas fermentadas a base extrato hidrossolúvel de soja (EHS) .....	57
4.2.5.1.	Determinação do número de células viáveis nas culturas liofilizadas para padronização do inóculo .....	58
4.2.5.2.	Preparo das culturas microbianas para obtenção do inóculo padronizado .....	58
4.2.5.2.1.	Cultura liofilizada YF-L812 .....	58
4.2.5.2.2.	Cultura liofilizada LA-5 .....	59

4.2.5.3. Ativação do inóculo para uso na produção da bebida fermentada por <i>L. acidophilus</i> (inóculo LA-5) .....	59
4.2.6. Elaboração das bebidas lácteas fermentadas com diferentes culturas lácteas.....	59
4.2.7. Preparo e adição da polpa de macaúba.....	62
4.2.8. Análise físico-química das bebidas fermentadas a base de EHS .....	63
4.2.9. Análises microbiológicas das bebidas fermentadas a base de EHS .....	63
4.2.10. Avaliação da vida de prateleira das bebidas fermentadas à base de EHS .....	63
4.2.10.1. Viabilidade das culturas lácteas no produto final .....	64
4.2.10.2. Determinação do pH e acidez titulável no produto final .....	64
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
6.1. Obtenção da polpa de macaúba <i>in natura</i> .....	66
6.2. Análises Físico-químicas polpa de macaúba .....	67
6.2.1. Composição centesimal .....	67
6.2.2. Determinação de Carotenoides Totais e Compostos Fenólicos Totais ...	70
6.3. Determinação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i> da polpa de macaúba.....	72
6.4. Análise microbiológica das polpas de macaúba.....	75
6.5. Testes preliminares no desenvolvimento das bebidas fermentadas a base de EHS.....	76
6.6. Preparo da cultura liofilizada para fermentação .....	77
6.6.1. Determinação do número de células viáveis nas culturas liofilizadas. ....	77
6.6.2. Padronização e determinação de células viáveis nas culturas lácteas ...	78
6.7. Processo fermentativo das bebidas à base de EHS .....	80
6.8. Análise físico química das bebidas fermentadas a base de EHS .....	82
6.9. Análise microbiológica das bebidas fermentadas .....	88
6.10. Análise de pH, acidez e viabilidade celular das formulações de bebida fermentada a base de EHS durante armazenamento refrigerado .....	89
6.10.1. Bebida fermentada sem adição de polpa de macaúba .....	89
6.10.1.1. pH e acidez.....	89
6.10.1.2. Viabilidade celular das culturas lácteas utilizadas .....	92
6.10.2. Bebida fermentada com adição de polpa de macaúba .....	94
6.10.2.1. pH e acidez.....	95
6.10.2.2. Viabilidade celular das culturas utilizadas .....	97
6.11. Considerações finais sobre vida de prateleira e monitoramento dos atributos avaliados nas bebidas fermentadas a base de EHS. ....	99
6.11.1. Bebidas fermentadas por <i>L. acidophilus</i> .....	100
6.11.2. Bebidas fermentadas por YF-L812 .....	101
6.11.3. Bebidas fermentadas por YF-L812 + <i>L. acidophilus</i> .....	102
7. CONCLUSÃO .....	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105

9.	ANEXOS .....	125
----	--------------	-----

## 1. INTRODUÇÃO

O termo “Alimentos Funcionais”, introduzido pelo governo do Japão em meados de 1980, surgiu como resultado do esforço em desenvolver alimentos que melhorassem a saúde da população. A crescente evolução do conhecimento das ações dos compostos ativos presente nos alimentos, tanto de origem animal quanto vegetal, mudou a perspectiva da ação da dieta sobre a saúde. Esse fato vem aumentando o interesse em melhorar a qualidade da nutrição e alimentação, com foco na redução dos gastos com saúde pública através da prevenção de doenças, melhoria da qualidade e da expectativa de vida (STRINGHETA et al., 2007, SANCHO e PASTORE, 2016).

Os alimentos funcionais devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas. Podem conter um ou mais compostos bioativos que, aliados à uma dieta equilibrada e atividades físicas, proporcionem efeitos fisiológicos benéficos ao corpo humano. Além disso, devem fazer parte da dieta usual do indivíduo (SOUZA, et al., 2003; CRUZ et al., 2007). Dentre os principais compostos responsáveis pela funcionalidade dos alimentos pode-se citar os ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, fibras alimentares, polióis, fitoesteróis, prebióticos, probióticos e proteína de soja (BRASIL, 2016).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidade suficiente promovem benefícios à saúde do hospedeiro equilibrando a microbiota intestinal. Permanecem vivos no produto fermentado ou não e são resistentes à passagem pelo trato gastrointestinal (GOMES E MALCATA, 1999; FERREIRA, 2001; SAAD et al., 2011). Para que um produto probiótico possa alegar promoção de saúde em sua rotulagem, deve ser demonstrado sua eficácia através de estudos científicos. Além disso, deve possuir a quantidade mínima viável necessária para exercer a propriedade funcional no final da validade do produto (BRASIL, 2016). Dentre os microrganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus*. Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*,

destacam-se *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (SANDERS e KLAENHAMMER, 2001; MARTINEZ et al., 2015). As bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os microrganismos mais utilizados pelas indústrias de alimentos para a produção de bebidas fermentadas probióticas e são normalmente dominantes no intestino humano (GOMES e MALCATA, 1999; SILVEIRA, 2009). *L. acidophilus* são definidos como bactérias gram-positivas homofermentativas. São resistentes ao pH estomacal e produzem compostos voláteis, como o diacetil, contribuindo para o sabor e aroma do produto. A utilização de *L. acidophilus* como cultura pura, ou combinadas com outras bactérias lácticas como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* apresentam bons resultados no desenvolvimento de bebidas fermentadas utilizando base láctea ou vegetal (BARBOSA, 2007; KOPPER, 2009).

A evolução dos conhecimentos científicos sobre a atuação dos probióticos, o aumento da expectativa de vida dos consumidores assim como a conscientização destes sobre a relação saúde e nutrição, são responsáveis pelo aumento do consumo e procura por alimentos funcionais (SANDERS, 1998; BRITO et al., 2012). Aliado a esse fato, o consumidor opta cada vez mais, por produtos que ao mesmo tempo, resultem em benefícios à saúde e sejam atrativos do ponto de vista sensorial (SILVEIRA, 2009; FERNANDES, 2013). Conseqüentemente, o mercado desses produtos tende a ser mais competitivo, permitindo que estudos e tecnologias sejam aperfeiçoadas e desenvolvidas.

A soja se destaca como fonte de origem vegetal e é uma boa opção de consumo para pessoas alérgicas e intolerantes ao leite de vaca (RIQUETTE, 2013). A soja e seus derivados têm recebido atenção em pesquisas por serem importantes fontes de fibras, oligossacarídeos com potencial prebiótico (rafinose e estaquiose), vitaminas e minerais, proteínas e isoflavonas (FUCHS et al., 2005; HAULY et al., 2005). Além de ser considerada importante para uma alimentação balanceada, fornecendo diversos nutrientes para a saúde humana.

Dentre os derivados da soja, o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) possui qualidades que permitem utilizá-lo como base para obtenção de produtos fermentados por possuir características semelhantes ao leite de vaca na

composição. Além disso, o EHS possui baixo custo e é de fácil obtenção (BERNAL-MONDRAGON, 2009). Entretanto, apesar das características positivas da soja e de seus derivados, o consumo no Brasil é limitado devido ao seu sabor desagradável e a presença de componentes indesejáveis como inibidores de tripsina, ácido fítico e dos oligossacarídeos de rafinose (causadores de flatulência). Além disso, a presença de proteínas como a glicinina e  $\beta$ -conglucina, podem causar reação de hipersensibilidade, comprometendo a mucosa intestinal (GRANT, 1989; ROSSI, 2000; PAULA, 2007). A fermentação do EHS permite melhorar essas características, uma vez que os produtos da fermentação mascaram o sabor desagradável da soja permitindo o desenvolvimento de produtos com melhores sabores (HOU et al., 2000; MORAES et al., 2006). Além disso, a fermentação pode melhorar o valor nutricional decorrente da redução de saponinas e fitatos (FAVARO TRINDADE et al., 2001).

O mercado de alimentos funcionais está em constante mudança e as organizações estão cada vez mais buscando novas tecnologias e aplicações de ingredientes que gerem atributos diferenciados aos seus produtos (GIANEZINI et al., 2012). Nesse sentido, o emprego de fontes naturais de compostos antioxidantes vem ganhando importância devido às suas propriedades funcionais. Reconhecidos como sendo compostos capazes de evitar o início ou propagação das reações em cadeia, que acontece nos organismos vivos, os antioxidantes estão presentes em várias fontes vegetais. As frutas são exemplo de fontes naturais de vitaminas C, vitaminas E, carotenoides e flavonoides; que possuem potencial antioxidante e efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular (HASSIMOTTO, 2005; VASCONCELOS et al., 2006; GAMA e SYLOS, 2007). As frutas do cerrado vêm ganhando destaque pelo seu potencial agrícola e sua utilização pela população local nas mais variadas formas e o estudo de suas propriedades podem auxiliar na avaliação do consumo e desenvolvimento de novos produtos (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2008). Dentre estas, o fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), uma palmeira típica do Brasil, possui propriedades nutritivas importantes. Com elevado teor de ácidos graxos insaturados e fibras alimentares, proteínas e carotenoides, o fruto da macaúba apresenta elevado potencial para o desenvolvimento de novos produtos, incluindo aqueles com apelo funcional (OLIVEIRA e ROCHA, 2008; SIQUEIRA, 2012).

Diante da crescente demanda do mercador consumidor por produtos funcionais e inovadores, a indústria de alimentos busca sempre a aplicação de tecnologias no desenvolvimento de novos produtos. A fermentação do EHS por bactérias lácticas, associada aos probióticos, possibilita o desenvolvimento de produtos fermentados não lácteos potencialmente nutritivos e funcionais. Além disso, o emprego de frutas regionais como a macaúba, podem contribuir com o potencial nutritivo de novas formulações.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Produzir bebidas fermentadas à base de extrato hidrossolúvel de soja (EHS) adicionada de polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) utilizando cultura láctea tradicional do iogurte e linhagem probiótica de *Lactobacillus acidophilus* (La-5).

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal da polpa de macaúba obtida;
- Determinar os compostos fenólicos totais, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e quantificar os carotenoides totais da polpa de macaúba obtida;
- Realizar análise microbiológica da polpa de macaúba obtida conforme legislação vigente;
- Desenvolver 3 formulações de bebida fermentada utilizando EHS contendo cultura comercial probiótica (linhagem de *Lactobacillus acidophilus* La-5), cultura tradicional do iogurte (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*) e a mistura de ambas;
- Determinar a composição centesimal do produto final;
- Avaliar a vida de prateleira do produto final em relação ao pH, acidez titulável em ácido orgânico (ácido láctico) e viabilidade das culturas lácteas;
- Realizar análise microbiológica do produto final segundo legislação vigente.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Alimentos Funcionais

A alimentação humana tem um significado muito maior do que prover apenas os nutrientes necessários para o desenvolvimento do homem. Por meio da alimentação, o homem busca suprir, além das necessidades energéticas, as de bem-estar, de satisfação e de saúde. A evolução tecnológica e os avanços científicos mudaram o perfil da sociedade. Apesar das desigualdades ainda existentes, a população mundial alcançou melhores condições socioeconômicas elevando a expectativa e a qualidade de vida e provocando mudanças no padrão alimentar (NITZKE,2012).

A busca pelo “padrão ideal” do corpo e da saúde, faz com que a população procure por alimentos que sejam além do não perecível, do transportável e fácil de preparar. Os alimentos devem ser seguros, sensorialmente e nutricionalmente adequados e devem contribuir para a diminuição do aparecimento de doenças e ainda prolongar a jovialidade do indivíduo (LAJOLO,2002; MONTANARI,2008;)

Esse cenário foi classificado como o início do desenvolvimento dos alimentos funcionais, e a partir desse momento surgiram questionamentos tecnológicos, legais e mudanças comportamentais (SIRÓ et al., 2008; NITZKE, 2012).

Os alimentos funcionais surgiram por volta de 1980, no Japão, decorrente de ação do governo daquele país com o objetivo principal de diminuir os custos com tratamentos e despesas médicas relacionados à população idosa em crescimento. Diante disso, iniciaram-se pesquisas na busca de prevenção de doenças e descobriu-se alimentos que forneciam benefícios à saúde além das necessidades nutricionais (MALTA et al., 2006; IKEDA, 2010; PLA, 2013).

Os alimentos funcionais podem ser definidos como aqueles que oferecem benefícios metabólicos e fisiológicos, além dos nutrientes básicos, podendo influenciar positivamente nos sistemas biológicos (BRASIL, 2002; VIDAL et al.; 2012). A sua ingestão regular associada á hábitos de vida saudável contribuem para a manutenção da saúde do consumidor. Podem ser classificados quanto à fonte de origem, vegetal ou animal; ou quanto aos benefícios que oferece, atuando em diversas áreas do organismo: sistema gastrointestinal, cardiovascular,

metabolismo de substratos, crescimento, desenvolvimento, diferenciação celular, comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SCHULKA, COLLA, 2014).

A funcionalidade destes alimentos está associada à presença de compostos bioativos (BASHO, 2010; FREITAS, 2014). Estes compostos, também denominados de fitoquímicos, são substâncias formada pelo metabolismo secundário das plantas intimamente relacionados aos mecanismos de defesa frente ao estresse ambiental (HORST e LAJOLO, 2007; VIZZOTTO et al., 2012). São encontrados em pequenas quantidades em frutas, hortaliças e grãos e sua ingestão por meio da dieta pode contribuir na manutenção dos sistemas biologicamente ativos (LIU, 2004; HO et al., 2010;). Em relação a natureza química e molecular, as substâncias bioativas podem ser classificadas em:

- Isoprenóides: carotenóides, saponinas, tocoferóis, tocotrienos e terpenos simples;
- Compostos fenólicos: cumarinas, taninos, lignina, antocianinas, isoflavonas, flavonoides;
- Proteínas, aminoácidos e afins: isotiocianatos, folato, colina, compostos alil sulfurados;
- Carboidratos e derivados: ácido ascórbico, oligossacarídeos, polissacarídeos não amiláceos;
- Ácidos graxos e lipídeos: poli-insaturados (PUFA), ômega-3, esfingolipídeos, lecitina;
- Minerais: Ca, Se, K, Cu, Zn;
- Microbiológicos: probióticos de diferentes espécies

Alimentos como a soja, aveia, tomate e óleo de peixe são exemplos de fontes de substâncias bioativas já reconhecidas (PACHECO e SGARBIERI, 1999; JONES, 2002; RODRÍGUEZ et al., 2003; PIMENTEL et al., 2005; FRANCO, 2006). Entretanto, vale ressaltar que apesar de ser um campo excelente de pesquisas na área de tecnologia de alimentos e dos benefícios que os alimentos funcionais oferecem a saúde, é de suma importância que a segurança da adição do componente e a alegação da funcionalidade seja baseada em critérios científicos rigorosos (FRANCO, 2006). O estudo da ação do composto em organismos biologicamente ativos deve ser avaliado, não só com intuito de fornecer o benefício,

mas sim considerando os efeitos da ingestão em excesso e a interferência em outros sistemas biológicos (JONES, 2002; RODRÍGUEZ et al., 2003; PADILHA e PINHEIRO, 2004; RIQUETE, 2013;).

### **3.1.1. Panorama Brasileiro dos Alimentos Funcionais**

No Brasil, a década de 90 marcou o início dos alimentos associados ao bem-estar e a saúde dos consumidores. Após o pioneirismo do Japão, os alimentos passaram a ser vistos como forma de promoção da saúde do consumidor brasileiro. 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” (FRANCO, 2006).

Em 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou as primeiras regulamentações sobre o uso de alimentos funcionais. As Resoluções ANVISA/MS nº 17/99 (Diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos), ANVISA/MS nº 18/99 (Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos) e ANVISA/MS nº 19/99 (Procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem) foram o marco legal para os alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde (RIQUETE,2013; BRASIL,2016). Essas resoluções apresentavam definições básicas de alegações e os princípios gerais para o uso dessas.

No mesmo ano, a ANVISA aprovou a Portaria 15/1999 que constituiu a Comissão de Assessoramento Técnico-Científica em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos - CTCAF, com a função de subsidiar a Diretoria de Alimentos e Toxicologia nas decisões relacionadas aos critérios de riscos dos alimentos. Em 2005, a CTCAF foi alterada para Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos com Alegação de Propriedade Funcional e, ou, de Saúde e Novos Alimentos pela Portaria 386/2005 (BRASIL,1999; BRASIL,2005).

Ao longo dos anos, várias outras resoluções foram aprovadas, em destaque para a Resolução RDC nº2 de 2002, que se aplica às diretrizes a serem adotadas para a avaliação de segurança, registro e comercialização de substâncias bioativas

e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e, ou, de saúde, apresentadas como formas farmacêuticas (BRASIL,2002).

Podemos ressaltar ainda o Informe Técnico nº9 de 2004 que trouxe orientação para utilização, em rótulos de alimentos, de alegação de propriedades funcionais de nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica (item 3.3 da Resolução ANVISA/MS nº18/99) (BRASIL,2004).

Após 5 anos da publicação das primeiras regulamentações pela ANVISA, os produtos até então aprovados como propriedades funcionais foram reavaliados pelo órgão. Adotando pesquisas científicas atuais e a percepção do consumidor frente a essas informações, a ANVISA decidiu que as alegações deveriam estar em concordância com as diretrizes do Ministério da Saúde e promoveu mudanças nas alegações até então utilizadas (STRINGHETA et al., 2007).

Em 2008, 9 anos após as primeiras regulamentações, a ANVISA publicou a lista das substâncias e de microrganismos reconhecidos para uso das alegações funcionais. A partir desse ano, os registros de novas alegações seriam feitos mediante comprovação científica da eficácia dos mesmos atendendo os dispostos das Resoluções RDC nº18 e nº 19 de 30 de abril de 1999.

Atualmente, a regulamentação do uso de substâncias bioativas permanecem em concordância com as resoluções aprovadas desde 1999. Em 2016, em mais uma atualização, a ANVISA publicou nova lista dos nutrientes e não nutrientes com as alegações padronizadas (Quadro 1) e seus respectivos requisitos específicos que estão em vigor.

**Quadro 1-** Compostos com alegação de propriedades funcionais atualizados pela Anvisa.

SUBSTÂNCIA	COMPOSTO	ALEGAÇÃO PADRONIZADA
<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>	Ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3 EPA – ácido eicosapentanoico DHA ácido docosaexanoico	“O consumo de ácidos graxos ômega 3 auxilia na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, desde que associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
<b>CAROTENÓIDES</b>	Licopeno	“O licopeno tem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Luteína	“A luteína tem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Zeaxantina	“A zeaxantina tem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
<b>FIBRAS ALIMENTARES</b>	Fibras alimentares	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Beta Glucana em farelo de aveia, aveia em flocos e farinha de aveia	“Este alimento contém beta glucana (fibra alimentar) que pode auxiliar na redução do colesterol. Seu consumo deve estar associado à uma alimentação equilibrada e baixa em gorduras saturadas e a hábitos de vida saudáveis”.
	Dextrina resistente	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.

	Frutooligossacarídeo – FOS	“Os frutooligossacarídeos – FOS (prebiótico) contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Goma guar parcialmente hidrolisada	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Inulina	“A inulina (prebiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Lactulose	“A lactulose auxilia o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Polidextrose	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Psillium ou psyllium	“O psillium (fibra alimentar) auxilia na redução da absorção de gordura. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Quitosana	“A quitosana auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
	Fitoesteróis	“Os fitoesteróis auxiliam na redução da absorção de colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
<b>POLIOIS</b>	Manitol / xilitol / sorbitol	“Manitol / Xilitol / Sorbitol não produz ácidos que danificam os dentes. O consumo do produto não substitui hábitos adequados de higiene bucal e de alimentação”
<b>PROBIOTICOS</b>	-	A alegação de propriedade funcional ou de saúde deve ser proposta pela empresa e será avaliada, caso a caso, com base nas definições e princípios estabelecidos na Resolução n. 18/1999.

<b>PROTEÍNA DE SOJA</b>	Proteína de soja	“O consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
-------------------------	------------------	--

Fonte: Anvisa, 2016. Com adaptações.

### 3.2. Probióticos

A interação existente entre o homem e os microrganismos data de muito antes das descobertas de aplicações de microrganismo no desenvolvimento de produtos. O corpo humano, em suas diferentes partes é habitado por trilhões de microrganismos. A pele, cavidades orais, trato gastrointestinal são alguns dos locais onde os microrganismos coabitam de maneira equilibrada e necessária a manutenção da saúde do corpo (TURNBAUGH et al. 2007; SCALDAFERRI et al., 2013; DOUILLARD et al., 2014; DALIRI et al., 2015;).

Ao nascer, o homem é considerado estéril e a colonização do corpo ocorre imediatamente após o nascimento. A transferência mãe-filho pode ocorrer através do parto e pelo leite materno. A colonização inicial do recém-nascido é responsável pela resposta imunológica e metabólica durante seu desenvolvimento e influência na susceptibilidade de doenças futuras (POKUSAEVA et al., 2011; VERSALOVIC, 2013; DALIRI et al., 2015). Dentre a microbiota presente no corpo humano, aquela que habita o trato gastrointestinal mantém as reações bioquímicas do hospedeiro em equilíbrio, evitando assim que microrganismos patogênicos possam exercer seu potencial causador de doenças (ZIEMER e GIBSON, 1998; WALL et al., 2009; BARBOSA et al, 2010).

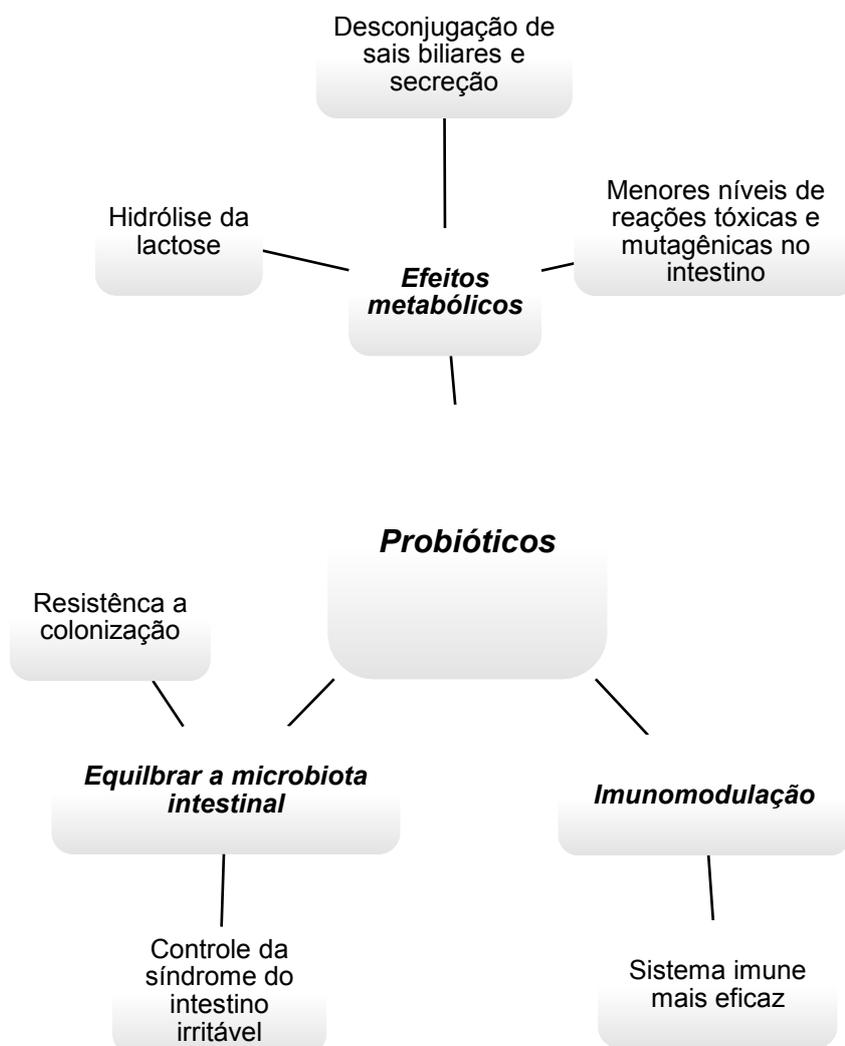
Esses microrganismos presentes ou isolados do trato gastrointestinal humano são amplamente estudados e aplicados no desenvolvimento de produtos e formulações por exercerem relações benéficas com o hospedeiro quando consumidos regularmente. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando consumidos em quantidades adequadas promovem benefícios a saúde do consumidor (FAO e WHO, 2006; HILL et al., 2014).

Acredita-se que os probióticos modulam a microbiota intestinal através do mecanismo de exclusão competitiva, impedindo a colonização da mucosa intestinal por microrganismos patogênicos (GUARNER & MALAGELADA, 2003). Através da competição por sítios de adesão no intestino, por nutrientes ou produção de bacteriocinas, os probióticos são capazes de impedir a proliferação de microrganismos indesejáveis. Além disso, os probióticos são capazes de aumentar a resistência imunológica do hospedeiro, uma vez que sua multiplicação ocorre em detrimento dos potenciais patógenos presentes (PUUPPONEN-PIMÄ et al., 2002;

GUARNER & MALAGELADA, 2003; NICOLI et al., 2003; BURITI et al., 2005; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). Algumas espécies são capazes ainda de modular a imunidade e a permeabilidade da mucosa digestiva, promovendo um aumento de circulação de células T (atuam contra antígenos externos) e células B (produzem anticorpos) além do aumento da produção de vitaminas do complexo B (GORBACH,2000; FIORAMONTI et al.,2003; JAIN et al., 2004; MARTINEZ et al., 2015).

Alguns efeitos benéficos da ação dos probióticos estão demonstrados na Figura 1.

**Figura 1-** Efeitos relacionados ao consumo de probióticos.



Para ser considerado um microrganismo probiótico, as cepas devem ser capazes de sobreviver a passagem do sistema digestivo, ser capaz de colonizar o intestino, resistir ao suco gástrico, pancreático e aos sais biliares (PUPIN, 2012). Ainda devem possuir aderência ao epitélio intestinal, possuir atividade antimicrobiana, não serem patogênicas e tóxicas e serem isoladas do trato intestinal humano (COEURET et al., 2004; GUARNER et al., 2005; BRANDT et al., 2006; MARTINEZ et al., 2015). Entretanto, o potencial probiótico de outras espécies de microrganismos não encontrados usualmente no trato gastrointestinal humano, a exemplo da *Saccharomyces boulardii*, também já foi evidenciado (GENEROSO et al., 2011). Algumas espécies exercem efeito benéfico mesmo não resistindo à passagem gástrica ou colonizando o intestino, como é o caso do *S. thermophilus*, que é capaz de produzir  $\beta$ -galactosidase no intestino melhorando a absorção de lactose. Em estudos recentes, há relatos de que células não viáveis são capazes de gerar respostas imunológicas benéficas à saúde, produzindo efeito anti-inflamatório (DROUAULT et al., 2002; REID et al., 2003; SANDERS, 2003; MATER et al., 2005; RANADHEERA et al., 2010).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* fazem parte do grupo das bactérias ácido lácticas (LAB) e se destacam como os mais adequados para emprego no desenvolvimento de produtos probióticos (FERREIRA, 2012; OMURA, 2014). A grande utilização de linhagens destes gêneros está relacionada aos efeitos benéficos comprovados e sua segurança de uso de longa data, apesar da existência de relatos de casos de infecções causadas por estes gêneros em indivíduos imunodeprimidos (VESTERLUND et al., 2007; CHERY, 2013).

O gênero *Lactobacillus* compreendem os microrganismos gram positivos, imóveis, catalase negativo (algumas espécies podem ser pseudo-catalase), forma bacilar ou coco bacilo agrupado em pares ou correntes. São anaeróbios facultativos e não esporulados. Possuem temperatura ótima de crescimento na faixa de 35-40 °C, e podem ser classificados em homo fermentativos obrigatórios, heterofermentativos obrigatórios ou heterofermentativo facultativo (OMURA, 2014).

*Lactobacillus acidophilus* é comumente empregado como cultura probiótica no desenvolvimento de produtos funcionais. Pioneiramente empregado em produtos de base láctea, sua aplicação atualmente se expande em diversos outros produtos alimentícios. Usados isoladamente ou em associação com outras culturas

lácteas, como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, cepas de *L. acidophilus* viáveis e não viáveis foram capazes de inibir a adesão de patógenos *in vitro*. Além disso cepas isoladas de *L. acidophilus* demonstraram efeitos antimicrobianos frente *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile* e *Campylobacter coli*, que são os principais agentes etiológicos relacionados a infecções entéricas. O uso associado com *Bifidobacterium* também revelaram inibição frente *H. pylori*. Em estudos experimentais, *L. acidophilus* foi eficaz contra *Salmonella enteritidis subsp. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *E. coli* e *S. aureus* (MICHETTI et al., 1999; YOUNG & HUFFMAN, 2003; SERVIN & COCONNIER, 2003; PANT et al., 2007).

A aplicação de *L. acidophilus* em diversas bases alimentares tem se mostrado eficaz e benéfica. Entretanto, o uso de qualquer espécie potencialmente probiótica deve ser pautada cientificamente na comprovação da ação sobre a saúde do consumidor desse probiótico. Estudos com o consumidor final devem ser realizados para garantir a comprovação da ação (FAO/WHO; 2001; SANDERS, 2003; BRASIL, 2016).

*L. acidophilus* (LA5) é um exemplo de linhagem probiótica cuja ação em humanos é bem documentada. A linhagem LA-5 possui eficácia comprovada e segurança de uso, sendo comumente empregada no desenvolvimento e aplicação em produtos alimentícios (JUNTUNEN et al., 2001, REID et al., 2003; JAIN et al., 2004; WANG et al., 2004).

### 3.3. Soja

A soja (*Glycine max*) é uma planta herbácea pertencente à família Fabaceae ou das leguminosas. Originária do sudoeste da Ásia, atualmente a soja é cultivada em diversas regiões do planeta devido a sua capacidade de adaptação e as pesquisas em melhoramento genético. O Brasil é o segundo maior produtor mundial do grão, alcançando produção de 113,923 milhões de toneladas na safra 2016/2017, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor brasileiro com cerca de 27% de toda a produção nacional (BIANCO et al., 2012, CONAB, 2017).

Apesar da maior parte da produção de soja ser destinada para *commodity*, vários outros setores industriais desenvolvem produtos e conquistam cada vez mais

mercado. A indústria energética utiliza o óleo de soja como principal fonte de produção de biodiesel. Essa matéria prima responde por 80% de toda a produção nacional (BRASIL, 2017). A soja ainda é utilizada na alimentação animal, sendo uma das principais matérias-primas utilizada no desenvolvimento de rações.

De grande versatilidade, o grão de soja é utilizado na alimentação humana de forma direta ou indireta e vem ganhando destaque pelas propriedades funcionais e nutricionais presentes. Fonte de proteínas de alta qualidade, a soja e seus produtos são amplamente consumidos em países asiáticos. Historicamente há relatos dos benefícios à saúde decorrente do consumo regular de soja. Além disso, a soja se destaca pela capacidade de fornecer compostos bioativos, como as isoflavonas, lipídeos, vitaminas e minerais. Nos países ocidentais, o consumo de soja vem crescendo graças ao avanço tecnológico. O melhoramento genético das linhagens cultiváveis possibilita a obtenção de grãos mais adaptados as exigências sensoriais dos consumidores. (SILVA et al., 2006; CARRAO-PANIZZI et al., 2012).

### **3.3.1. Potencial funcional da soja**

A proteína de soja é uma excelente fonte proteica dentre os vegetais. Possui quase a totalidade de aminoácidos essenciais (exceto os sulfurados) podendo ser comparada à proteína de alta qualidade animal. Na soja, as proteínas predominantes são as globulinas de reserva. Apresentam 4 frações e são sintetizadas durante o desenvolvimento do grão juntamente com os lipídeos. A fração 11S conhecida como glicinina representa cerca de 37% do total das proteínas da soja. A fração 7S possui cerca de 90% de  $\beta$ -conglucina (glicoproteína) além de enzimas como  $\beta$ -amilase e lipoxigenase. Juntas, essas duas frações representam a maior parte das proteínas presentes no grão (BHATHENA, 2007). Em menor quantidade, na fração 2S, estão os inibidores de tripsina. Esses compostos são fatores antinutricionais e precisam ser inativados para evitar interferência na absorção e digestibilidade da proteína, reduzindo seu valor biológico. Por fim, a fração 15S engloba demais proteínas presentes no grão.

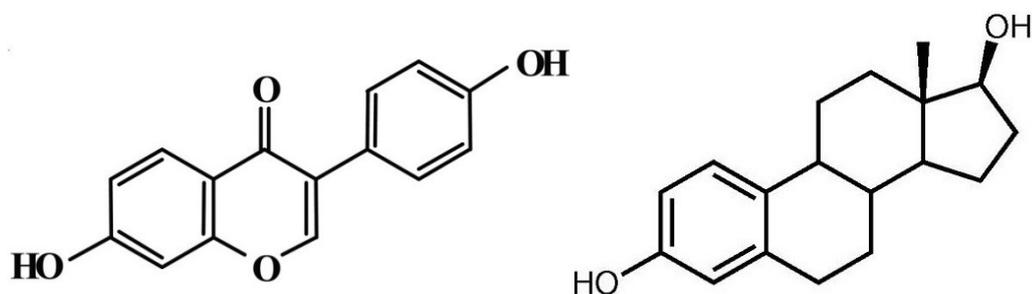
Por ser uma proteína de baixo custo com propriedades benéficas já reconhecidas, é utilizada como fonte proteica na alimentação humana em diversas preparações alimentares e em dietas vegetarianas. Os derivados proteicos de soja

são amplamente utilizados nas formulações de produtos alimentícios devido suas propriedades organolépticas, hidrofílicas, intermoleculares e interfásicas. Estas propriedades possibilitam melhoramento tecnológico de produtos cárneos, pães e sopas, além de diminuir custo de produção e ainda contribuir na suplementação proteica. Entretanto, vale ressaltar que as propriedades tecnológicas das proteínas de soja são dependentes das condições de cultivo, colheita, estocagem e processamento (GOÉS-FAVONI, 2004).

A soja e seus subprodutos, em função do teor e qualidade de proteína e presença de fitoesteróis, se destaca por apresentam funcionalidades benéficas à saúde humana. Está associada à prevenção e a ação terapêutica, reduzindo o risco de algumas doenças crônicas e degenerativas como doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer (mama, útero, próstata), osteoporose, além de alívio dos sintomas da pós-menopausa. A proteína da soja atende ao requisito de alimentos com alegação de propriedade funcional reconhecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sendo seu consumo associado a redução dos níveis de LDL-colesterol (HOU, 2000; RODRIGUES, 2003; WILLE et al., 2004; ZHOU, 2004; MA et al., 2004; GUIMARÃES, 2005; EMBRAPA SOJA, 2007; BRASIL, 2017)

As isoflavonas, um fitoesterol presente na soja, são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas que interagem quimicamente com receptores de estrógenos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) do corpo humano devido a sua similaridade com o  $\beta$ 17-estradiol (Figura 2). Desta forma, as isoflavonas atuam no organismo como estrógenos verdadeiros, equilibrando os níveis dos estrógenos endógenos sem os efeitos colaterais destes.

**Figura 2-** Estrutura do estradiol e isoflavona



Isoflavona (Daidzeína)

Estradiol

Fonte: Garrido et al., 2006.

As isoflavonas apresentam 4 formas químicas dependentes do radical que a compõem totalizando 12 formas diferentes ou isômeros, conforme descrito abaixo:

- Isoflavonas aglicoladas: daidzeína, genistéina e gliciteína
- B-glicosídeos: daidzina, genistina e glicitina
- Derivados glicosilados acetilados: 6-“O-acetil daidzina, 6-“O-acetil genistina, 6-“O-acetil glicitina.
- Derivados malonilados: 6-“O-malonildaidzina, 6-“O-malonilgenistina, 6-“O-malonilglicitina.

Estudos demonstram que o consumo regular de isoflavonas contribui na prevenção de doenças cardiovasculares, alguns cânceres, osteoporose e sintomas de menopausa.

Nos alimentos, as isoflavonas apresentam-se conjugadas com glicosídeos. Nesta forma, não são absorvidas pelo organismo devido ao seu tamanho e por seu caráter hidrofílico. Apenas as isoflavonas livres são capazes de atravessar as membranas do epitélio, sendo necessário a hidrólise das isoflavonas conjugadas pelo organismo do indivíduo.

As isoflavonas são podem contribuir com amargor e adstringência. Esses atributos sensoriais indesejados podem ser reduzidos pelo tratamento térmico aplicado. Além destas alternativas tem-se o melhoramento genético que pode obter genótipos com sabor suave, pela supressão de lipoxigenases (ARAÚJO et al., 1997).

Apesar das propriedades nutricionais importantes presente na soja, os atributos sensoriais são os principais fatores de rejeição dos produtos derivados desta. A presença de oligossacarídeos não digeríveis como estaquiose e rafinose, causadores de flatulência em indivíduos sensíveis e dor abdominal reduzem seu consumo. Entretanto, a soja e seus derivados constituem-se em matérias-primas altamente promissoras para uso na indústria de alimentos, contribuindo no desenvolvimento de produtos nutricionalmente importantes e economicamente de baixo custo (RODRIGUES, 2003; GUIMARÃES, 2005).

### **3.3.2. Extrato Hidrossolúvel de soja**

Aliado ao seu apelo funcional, a utilização dos derivados de soja, dentre eles o extrato hidrossolúvel, possibilitou o desenvolvimento de uma gama de novos produtos expandido o mercado e apresentando outras alternativas no consumo de proteínas vegetais (GENOVESE & LAJOLO, 2001; BRASIL, 2016).

O EHS, popularmente chamado de “leite de soja”, é o produto obtido pela extração aquosa dos grãos de soja. Nesse extrato estão dispersos proteínas, carboidratos, lipídeos e alguns minerais. A obtenção do extrato envolve as etapas de descascamento, hidratação, desintegração à quente, suspensão em água, cozimento e filtração. Pode ainda ser processado na forma de pó, solúvel em água, por meio de técnicas apropriadas (HOU et al., 2000; RODRIGUES, 2003).

O potencial tecnológico do EHS pode ser associado à sua semelhança com o leite bovino. Utilizado na dieta de crianças e adultos intolerantes a lactose ou alérgicas ao leite bovino, o mercado de produtos de soja vem se expandindo e a necessidade de desenvolvimentos de novas aplicações se tornam cada dia mais necessárias (MORAES, 2002; RODRIGUES, 2003).

Apesar das melhorias dos cultivares utilizados e da expansão do consumo, a soja e seu extrato ainda encontram barreiras ligadas às características sensoriais dos produtos. 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 que são responsáveis pela adstringência e o sabor característicos de feijão cru, limitando o consumo e o desenvolvimento de produtos utilizando essa base vegetal (MARFO et al., 1990; MORAES, 2002).

Os processos fermentativos apresentam resultados positivos na melhoria dos atributos sensoriais dos produtos à base de soja. Estudos realizados por Bernal-Mondragon (2004), Machado (2006) e Riquete (2013) demonstraram o potencial do EHS no desenvolvimento de bebidas fermentadas com culturas lácteas puras e associadas com bactérias probióticas, dentre elas, o *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*.

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 et

al., 2005). 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” (CUENCA e 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 (UMBELINO et al., 2001).

### **3.4. Macaúba**

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro ocupando uma área de 2 milhões de quilômetros quadrados, correspondendo a 22% do território nacional. Considerado o bioma mais rico do planeta, o cerrado brasileiro é berço de nascentes hidrográficas importantes no território nacional, como as bacias Araguaia-Tocantins e São Francisco. Possui uma vegetação caracterizada por coberturas rasteiras, arbustos, árvores esparsas e tortuosas, de casca grossa, folhas largas e raízes profundas e estende-se pelos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Ceará, Pará, Rondônia, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Paraná, e Distrito Federal (Figura 4) (CARRAZZA e ÁVILA, 2010; OLIVEIRA e SCARIOT, 2010).

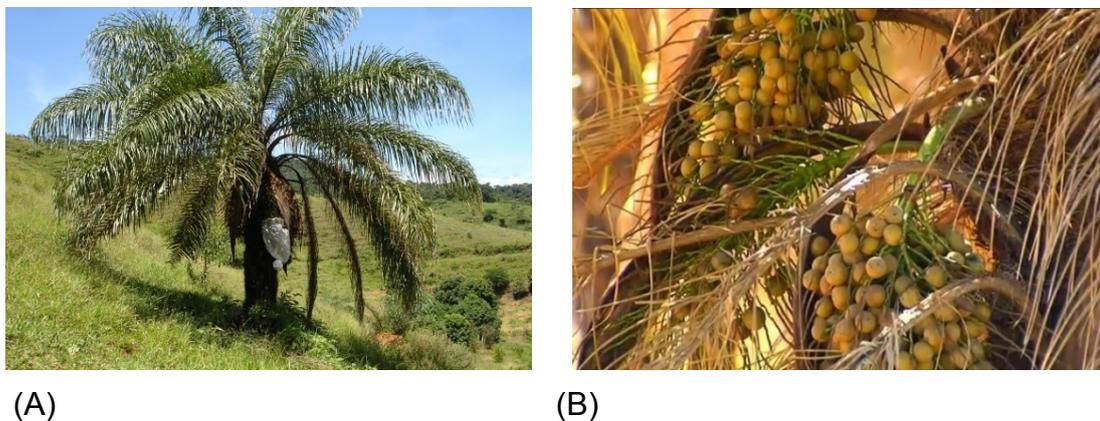
**Figura 4- Cerrado Brasileiro.**

Fonte: BRASIL, 2015.

Dentre as riquezas encontradas no cerrado brasileiro, a diversidade de espécies vegetais com suas características sensoriais peculiares e potencial nutricional vem despertando o interesse científico e se tornando uma fonte de renda para as populações rurais inseridas nesse bioma (SIQUEIRA, 2012; DAMIANI et al., 2013).

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart) (Figura 5) é uma palmeira típica do cerrado brasileiro. Pertencente à família Arecaceae, a macaúba pode ser encontrada em diversos estados sendo Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo e Tocantins os locais de maior concentração (SILVA, 2007; CICOCINI, 2012). Possui grande potencial de exploração devido a elevada produção de óleo e o aproveitamento total dos coprodutos. Além disso, ela é útil na recuperação de pastagens degradadas e em plantios consorciados, sendo sua produção sustentável do ponto de vista ambiental, social e econômico (GRAY e KUNZE, 2014; ZANATTA, 2015).

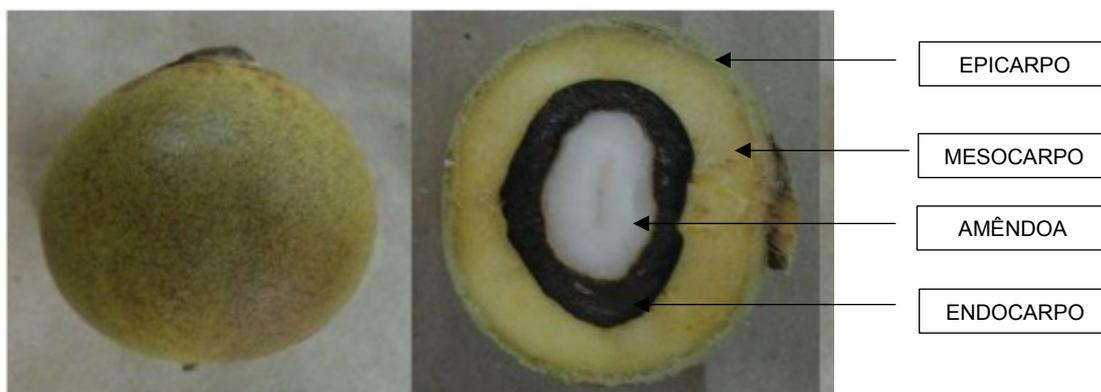
**Figura 5** – Palmeira macaúba (A) e aspectos dos frutos (B) durante desenvolvimento



Fonte: Portal Macaúba, 2016.

Popularmente, a macaúba também é conhecida como bocaiúva, bacaiuveira, bacaúva, coco-babão, coco-de-catarro e imboçaia. Os frutos são dispostos em cachos e possuem 4 partes distintas: epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa (Figura 6) (ARGANDOÑA- SANJINEZ ,CHUBA,2011).

**Figura 6** - Macaúba e suas partes



Fonte: ALMEIDA, 2014 com adaptações.

Os frutos maduros da macaúba possuem formato esférico, com diâmetro variando entre 2,5 e 6,0 cm. O epicarpo ou casca é rígido, tornando-se quebradiço após a maturação. O mesocarpo é formado pela polpa que se apresenta amarelada, fibrosa, mucilaginosa, comestível, adocicada e rica em lipídeos e glicerídeos. A polpa envolve o endocarpo de coloração marrom claro a escuro,

duro, formado principalmente por lignina e holocelulose. E a amêndoa apresenta como fonte de lipídeos saturados e proteínas. Da massa total dos frutos da macaúba, 24,1% (m/m) são representados pela casca, 39,6% (m/m) pela polpa, 29,0% (m/m) pelo endocarpo e 7,3% (m/m) pela amêndoa. A qualidade dos frutos da macaúba e de seus derivados pode ser determinada pela associação de atributos, combinando fatores fisiológicos, como grau de desenvolvimento e amadurecimento, com os fatores físicos e químicos (MIRANDA et al., 2001; LORENZI, 2006; FARIAS, 2010).

Na época da frutificação, os frutos caem no solo, sendo coletados de forma extrativista, diretamente no chão durante este período. Foices e redes também são usados na colheita dos frutos. Devido principalmente ao alto teor de lipídeos, os frutos são perecíveis sendo necessário sua conservação em pós-colheita e precaução no momento da seleção e processamento do fruto para manutenção das suas propriedades físicas e químicas (SILVA, 2007; FARIAS, 2010). Os frutos maduros possuem sabor característico, agradável ao paladar, mais suaves nos frutos recém caídos e mais acentuado e medido que o fruto amadurece (CARVALHO et al., 2011; SANTOS JUNIOR et al., 2012). Estima-se que cada cacho da fruta produz 6,32 kg de polpa e 1,36 kg de amêndoa. Considerando que cada palmeira produza 7 cachos, a produção média anual é cerca de 44,24 kg e 9,52 kg respectivamente (SANJINEZ-ARGADOÑAN, CHUBA, 2011). A casca que envolve a amêndoa pode ser transformada em carvão, pelo alto poder calorífico e ainda substituir a brita no concreto para construção civil, além de outras aplicações.

Não há registro de processamento industrial de frutos de macaúba para consumo alimentar humano. Sua aplicação no desenvolvimento de produtos ainda é incipiente e ocorre em regiões de ocorrência da palmeira (SIQUEIRA, 2012) onde pequenas indústrias familiares produzem, principalmente, farinha, sorvete e licor da polpa do fruto e utilizam amêndoa para consumo *in natura* (LORENZI, 2006; SIQUEIRA, 2012).

Para a alimentação humana, a macaúba pode contribuir nas formulações alimentares devido à presença de compostos bioativos como os carotenoides e compostos fenólicos, e minerais como zinco, cobre e potássio (SIQUEIRA, 2012; FERREIRA et al., 2013). A polpa de macaúba possui composição química importante, sendo classificada como fonte de cobre, zinco e potássio e fibras, além

de fornecer quantidades significativas de lipídeos e proteínas (RAMOS et al., 2008). Além disso é fonte de carotenoides provitamina A e sua utilização alimentar poderia oferecer elevado valor nutricional inclusive em programas de suplementação alimentar ou merenda escolar (MORAIS, 2006; OLIVEIRA & ROCHA, 2008).

O fruto da macaúba possui perfil lipídico diferente em relação a polpa e amêndoa. O óleo da polpa de macaúba tem alto teor de ácido graxo monoinsaturado. O ácido oleico (18:1) representa cerca de 92% da composição dos ácidos graxos monoinsaturados presentes. Estudos indicam que esse ácido graxo insaturado participa do metabolismo do corpo humano, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios. Acredita-se que auxilie na dissolução dos depósitos de colesterol nas artérias. Observa-se ainda a presença dos ácidos graxos ômega 6 (C18:2) e do ômega 3 (C18:3) em menores quantidades. Os tocoferóis estão presentes em quantidades significativas, indicando potencial para o uso nas preparações alimentares (COIMBRA; JORGE, 2012; ZANATTA, 2015). Em relação ao óleo da amêndoa, C12:0 (láurico), é o mais abundante e sua aplicação vai desde a fabricação de tensoativos para shampôs, como o lauril éter sulfato de sódio, até aditivos alimentícios como emulsificante (CANO ANDRADE et al., 2006). A Tabela 1 apresenta a composição média da polpa e semente de macaúba.

**Tabela 1-** Composição química média da polpa e amêndoa de macaúba

<b>Componentes</b>	<b>Amêndoa</b>	<b>Polpa</b>
Valor energético (Kcal/100 g)	561,23	285,65
Umidade (g/100 g)	6,5	34,32
Proteínas (g/100 g)	17,57	2,76
Lipídios (g/100 g)	51,71	14,93
Carboidratos (g/100 g)	5,39*	35,06**
Fibra alimentar (g/100 g)	17,23	11,14
Cinzas (g/100 g)	1,99	1,78

Fonte: (Silva et al., 2008; Marin et al., 2009; Ramos et al., 2008; Hiane et al., 2006) com modificações. \* açúcares redutores e não redutores; \*\* teor de carboidratos medido por diferença.

### 3.5. Compostos Bioativos

Os compostos bioativos são substâncias, não nutrientes, que exercem efeitos fisiológicos ou ação metabólica específica. São derivados de metabólitos secundários de plantas relacionados aos seus sistemas de defesa a fatores adversos como radiação e ataque de pragas. Estão presentes em pequenas quantidades em vegetais, frutas e grãos (BRASIL, 2002; LIU, 2004; HORST e LAJOLO, 2007; HO et al., 2010).

Apesar da grande quantidade de compostos bioativos já identificados em espécies vegetais, muitos ainda são desconhecidos. Apresentam estrutura química específica a qual é responsável pela sua funcionalidade. Os compostos bioativos estão intimamente relacionados com redução de várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como câncer e aterosclerose, devido principalmente à atividade antioxidante (PODSEDEK, 2007).

O estresse oxidativo causado pelo desbalanço entre o sistema antioxidante e a produção de compostos oxidativos como os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (EROS), causam alterações oxidativas em moléculas responsáveis pela modulação e expressão gênica em processos inflamatórios. Desta forma, os compostos bioativos atuam na estabilização desses radicais livres, na inibição da cadeia de iniciação ou na finalização da cadeia de propagação das reações oxidativas. Os compostos fenólicos, algumas vitaminas (C e E) e os carotenoides são os compostos bioativos que vem despertando interesse devido a sua comprovada atuação contra esses mecanismos oxidativos (KAWANISHI et al., 2002; LAGUERRE et al., 2007). Apesar do organismo humano possuir sistemas de defesa de origem enzimática (superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), glutadiona peroxidase (GPx) e sistemas tioredox) e não enzimática (glutathiona (GSH), vitamina A, vitamina C, vitamina E, zinco e selênio) eficazes contra as EROS, a presença de antioxidantes exógenos contribui para a resistência ao estresse oxidativo. A ingestão regular de fontes desses compostos como frutas, verdura e grãos contribui para a manutenção do equilíbrio das reações oxidativas deletérias ao organismo (LIU, 2004; DAI & MUMPER, 2010; NIKI, 2010; MALTA et al., 2012).

### 3.5.1. Antioxidantes

Antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres ou das espécies reativas não radicais. São substâncias que inibem ou retardam os efeitos da oxidação. Apresentam diferentes propriedades protetivas e mecanismos de ação distintos sendo classificados em (MAISUTHISAKUL et al., 2007):

- Antioxidantes primários: aqueles capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis.
- Antioxidantes secundários: que evitam os processos oxidativos por meio de ligação de íons metálicos (alteração de valência); inativação de ERO, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares.

Os antioxidantes naturais vêm despertando grande interesse entre cientistas e consumidores, por apresentarem potencial de emprego no desenvolvimento de alimentos funcionais. (LAGUERRE et al., 2007). Dentre as fontes desses antioxidantes, os frutos brasileiros tem sido objeto de estudo sobre suas propriedades nutricionais e bioativas (RUFINO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011; SOUZA et al., 2012). A caracterização físico-química de frutos tropicais, exóticos ou não, e a investigação de suas propriedades funcionais, decorrentes das altas concentrações de vitaminas, minerais, compostos fenólicos e carotenoides, tem sido de crescente interesse da comunidade científica. Estudos indicam que manter quantidades satisfatórias dessas substâncias podem proteger as células contra processos degenerativos por meios da manutenção de metabolismos reparatórios e compensadores, como a função antioxidante (NEVES, 2012).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Pode-se citar o método de captura de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), ABTS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), pelo antioxidante de redução do ferro (FRAP), da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, análise por fluorescência por

meio de ensaio fluorimétrico, sequestro do radical peroxil, método ORAC, dentre outros (ALVES, et al. 2010).

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Já o método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico.

O método Poder Antioxidante de Redução do Ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power FRAP) foi descrito como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros (Pulido et al. 2000). O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (RUFINO et al., 2007c).

### **3.5.2. Carotenoides**

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pela cor amarela, laranja ou vermelha de vários alimentos. Encontrados acumulados nos cloroplastos de todas as plantas verdes, em bactérias fotossintéticas, em fungos filamentosos, os carotenoides podem também estar presente em alimentos de origem animal, como ovos e leite (UENOJO et al., 2007). Os tecidos de plantas comestíveis contêm uma ampla variedade de carotenoides sendo os tomates (licopeno), cenouras ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno), milho (luteína e zeaxantina), pimentas vermelhas (capsantina), urucum (bixina) e batata doce ( $\beta$ -caroteno) alguns exemplos de fontes (SILVA et al., 2010).

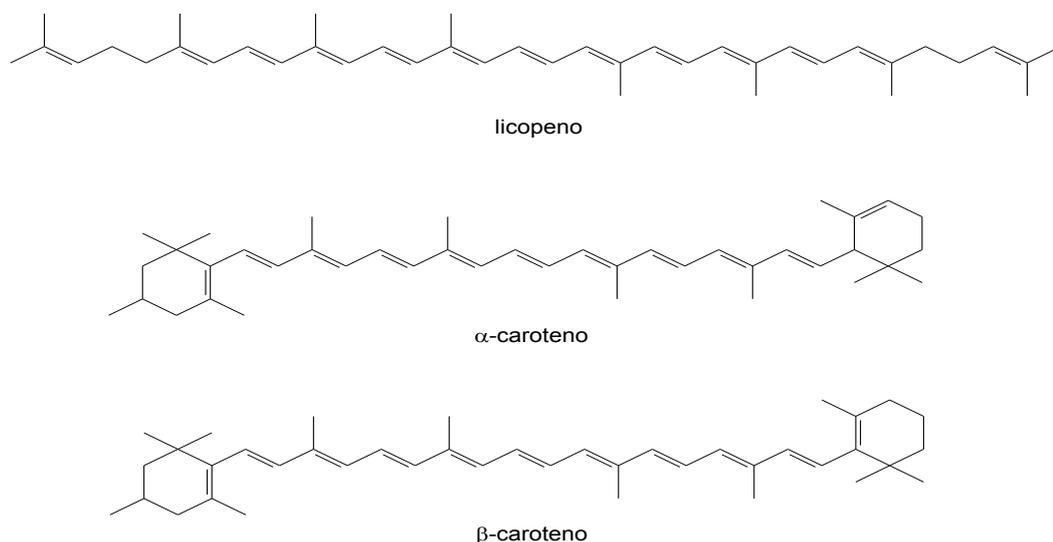
Os carotenoides são sintetizados apenas pelos vegetais, sendo estas as únicas fontes deste nutriente para os animais, incluindo humanos. Seus efeitos

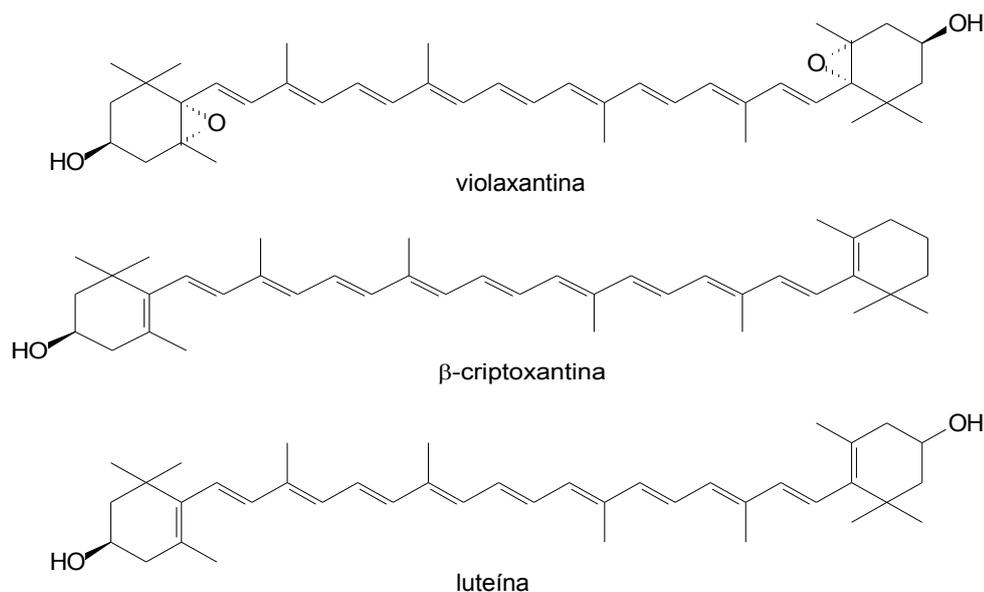
benéficos à saúde despertam o interesse da comunidade científica no mundo inteiro (QUIRÓS & COSTA, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Os carotenoides são compostos lipossolúveis, solúveis em solventes orgânicos que apresentam estrutura comum formada por uma cadeia de polieno (longo sistema de ligações duplas conjugadas) que influencia suas propriedades física, químicas e bioquímicas. O sistema conjugado e rico em elétrons do polieno é responsável pela atividade antioxidante dos carotenóides que atuam tanto na absorção do oxigênio singlet, sendo o licopeno o mais eficiente, quanto de radicais livres, para interromper as reações em cadeia onde eles estão envolvidos (QUIRÓS & COSTA, 2006; MCNULTY, *et al.*, 2007; DAMODARAN *et al.*, 2008; SIKORA *et al.*, 2008).

Quimicamente, os carotenoides são compostos polisoprenoides e podem ser divididos em dois grandes grupos: carotenos (licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno) e xantofilas (violaxantina,  $\beta$ -criptoxantina e luteína) conforme Figura 3.

**Figura 3 - Estrutura química dos carotenoides**





Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, 1999.

Os carotenos são compostos constituídos apenas por carbono e hidrogênio com graus de insaturação variados. O licopeno e o  $\beta$ -carotenos são os principais exemplos de carotenos. As xantofilas são os carotenoides que apresentam função química oxigenada derivada de reação de hidroxilação ou epoxidação. As funções químicas oxigenadas podem ser grupos hidroxilas, ceto, epoxido e aldeído. Os principais exemplos de xantofilas são a luteína e  $\beta$ -criptoxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; RIVERA, GARAYOA, 2012)

O  $\beta$ -caroteno possui a maior atividade de provitamina A devido a sua estrutura contendo duas moléculas de retinol (Vitamina A). O consumo de alimentos ricos em  $\beta$ -caroteno auxilia no fornecimento de retinol, que atua no crescimento, na visão, na integridade do sistema imunológico e dos tecidos (YUYAMA, 2007).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise da FAFAR/UFMG, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Laboratório de Bromatologia e na Planta Piloto de Produtos Vegetais e Bebidas, todos localizados no DEALI/ENUT/UFOP.

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Matérias-primas

Os frutos da macaúba utilizados neste estudo foram adquiridos diretamente da Cooperativa de Agricultores Familiares e Agroextrativista Ambiental do Vale do Riachão (Cooper Riachão), localizada no Norte de Minas Gerais. Para a formulação base da bebida fermentada à base de soja foram utilizados Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS) marca Provesol SM-N, doados pela empresa Olvebra®, açúcar cristal Minasçucar adquirido no comércio local e amido modificado Amidomax 5500 doados pela empresa Cargill. Utilizou-se o mesmo lote de todos os ingredientes para as produções.

#### 4.1.2. Culturas microbianas liofilizadas

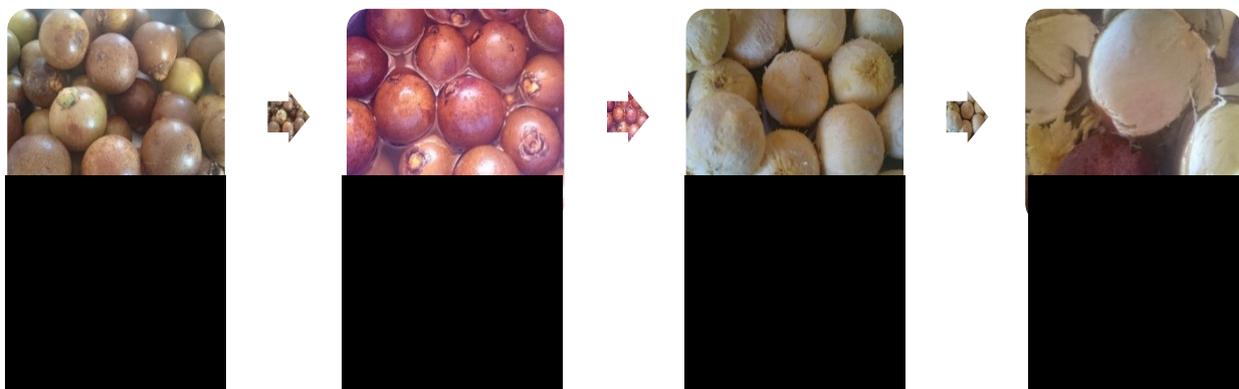
Foram utilizadas cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (LF-Y812, Chr. Hansen) do tipo DVS “direct vat set”. Os envelopes contendo as culturas foram adquiridos da empresa Macalé (Juiz de Fora, Brasil). Também foram utilizados cultura pura de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5, Chr. Hansen) gentilmente doados pelo DEALI/ENUT/UFOP.

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Obtenção da polpa de macaúba *in natura*

Os frutos foram fornecidos pela Cooperativa Riachão, coletados durante o período de 07/11/16 a 19/11/16. O peso total de fruta obtido foram 29,85 kg, sendo 14,60 kg referente a primeira semana (07/11 a 12/11) e 15,25 kg referente a segunda semana (14/11 a 19/11). Apresentaram-se maduros (a maturação ideal do fruto é indicada quando este cai do pé espontaneamente), globoso e liso, com casca íntegra de coloração marrom-amarelada. Os frutos foram identificados como lote 1 (coleta na primeira semana) e lote 2 (coleta na segunda semana) e transportados em caixas de madeira até a Planta Piloto de Produtos Vegetais e Bebidas da ENUT/UFOP onde foram armazenados à temperatura ambiente (devido à sensibilidade da fruta à exposição ao frio) por 2 dias, até o processamento. Na Figura 7 pode-se observar o processamento simplificado das amostras. Inicialmente, cada lote foi lavado em água potável para retirada de sujidades e selecionado quanto à integridade da casca, ausência de ataque de pragas e ausência de deterioração. Após a lavagem e seleção, os lotes foram higienizados, deixando-os de molho com solução clorada de 200 ppm por 20 minutos (BRASIL, 2004). Após o tempo de higienização, os frutos foram descascados e a polpa (mesocarpo da fruta) foi retirada manualmente com auxílio de faca. Por fim, a polpa obtida (integral sem adição de água ou qualquer outra substância) foi pesada, obtendo 6,07 kg para o lote 1 (primeira semana) e 6,13 kg para o lote 2 (segunda semana), acondicionadas em sacos de polietileno e mantida em freezer a -18 °C até o momento da utilização. Os resíduos gerados (cascas, caules e amêndoas) foram descartados.

**Figura 7-** Processamento simplificado das amostras de Macaúba



Fonte: o autor, 2017.

## **4.2.2. Análises físico-químicas da polpa de macaúba**

### **4.2.2.1. Composição Centesimal da Polpa**

A composição centesimal das amostras de polpas de macaúba foi realizada no Laboratório de Bromatologia da Escola de Nutrição, na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) de acordo com os métodos descritos na AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2012) com adaptações. O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, por secagem direta em estufa a 105 °C (Biopar, S150SD) até peso constante. A determinação de lipídeos foi realizada por extração direta em Soxhlet (Fanem), utilizando éter de petróleo como solvente extrator. O teor de proteína foi realizado pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando digestor (Kjeldatherm, Gerhardt) e destilador de proteínas (Tecnal, TE-0363) e adotando fator de correção de nitrogênio de 6,25. A determinação do teor de cinzas foi realizada por incineração em mufla (Fornitec, 2061) a 550 °C. A determinação de fibra alimentar total e suas frações (solúvel e insolúvel) foi realizada por digestão enzimática (alfa amilase termorresistente AMG 300L, pancreatina Alcalase 2.4 L FG e pepsina Termamyl 2X) seguida de filtração e precipitação da fração solúvel em álcool etílico. Após a filtração, os cadinhos foram secos em estufa a 105 °C por 12 horas, resfriados em dessecador e pesados. Parte dos cadinhos foram usados para determinação de cinzas e parte para determinação de proteínas não digeríveis nas mesmas condições descritas acima. O teor de carboidratos das amostras foi obtido por diferença encontrada entre 100 g da amostra e a soma dos teores de proteínas, lipídeos, umidade, cinzas e fibras alimentares presente em cada amostra.

### **4.2.2.2. Determinação de carotenoides totais na polpa de macaúba**

A determinação do teor de carotenoides totais foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Rodriguez-Amaya et al. (1976) com adaptações. As amostras e os extratos obtidos foram protegidos da luz difusa durante todo o procedimento de determinação. Foram pesados 1,0 g de polpa de macaúba em tubo tipo falcon de 50 mL e acrescentados cerca de 0,05 g de celite (545 P.A,

Dinâmica). Adicionou-se 25 ml de acetona (P.A, Êxodo Científica) às amostras, homogeneizando-as a 7558 x g por 1 minuto em ultraturrax (Modelo IKA T10, Biovera). Em seguida o extrato foi filtrado a vácuo. O procedimento de extração com acetona e filtração foi repetido até que a amostra perdesse completamente a coloração característica de carotenoides, o que ocorreu após a quarta extração. O extrato combinado foi transferido quantitativamente para um funil de separação e adicionados 40 mL de éter de petróleo (P.A- A.C.S, Alphatec). Em seguida, realizou-se três lavagens sucessivas com 150 mL de água ultrapura para remoção da acetona. A cada lavagem, a fase aquosa foi retirada com cuidado para evitar perdas da fase contendo éter de petróleo e os carotenoides extraídos. Por fim, a fase contendo os carotenoides foi filtrada empregando-se de sulfato de sódio anidro (P.A, Dinâmica) para retirada da água remanescente. O extrato final foi transferido para balão volumétrico de 50 mL completando-se o volume com éter de petróleo e submetido à leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro modelo UV-5100, Global Trade Technology) a 450 nm. Para a curva analítica padrão foram preparadas soluções de  $\beta$ -caroteno em sete níveis de concentração (0,5 - 2,15  $\mu\text{g/mL}$ ) em triplicata de cada nível, obtendo a curva analítica padrão de  $\beta$ -caroteno. Para o cálculo da determinação de carotenoides totais (expressos em  $\mu\text{g}$   $\beta$ -caroteno) foi utilizada a equação da reta da curva analítica padrão construída com o  $\beta$ -caroteno (Anexo 1), fazendo-se a correspondência entre a absorbância da amostra e a concentração de  $\beta$ -caroteno.

#### **4.2.3. Determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* na polpa de macaúba**

##### **4.2.3.1. Obtenção dos extratos**

A extração foi realizada segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007a) com adaptações. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente protegido da incidência de luz difusa. Foram pesados 0,5 g das amostras aos quais adicionou-se 1,0 mL de solução de metanol 50% (UV/HPLC, Vetec). A amostra foi macerada e homogeneizada em ultraturrax, em velocidade máxima, por 1 minuto e deixada em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi

centrifugada a 17800 x g por 15 minutos e o sobrenadante transferido para balão volumétrico de 5 mL. Ao resíduo da primeira extração, adicionou-se 1,0 mL de solução de acetona 70% (P.A-ACS, Êxodo Científica) e repetiu-se o procedimento para a primeira extração. Após a segunda extração, completou-se o balão volumétrico com água ultrapura e armazenou o extrato sob refrigeração até o momento da análise.

#### **4.2.3.2. Determinação dos compostos fenólicos totais**

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método Folin Ciocalteau (WATERHOUSE, 2002; SHAHIDI e NACZK, 2004) usando o ácido gálico como padrão para curva analítica padrão. A partir de uma solução estoque de ácido gálico de concentração 200 µg/mL (P.A, Vetec) foram realizadas diluições a fim de se obter as concentrações necessárias (10-100 µg/mL) para a construção da curva analítica padrão usada na análise. Para um tubo de ensaio devidamente protegido da luz, foram transferidos alíquota de 0,5 mL de cada extrato das amostras obtido anteriormente e 2,5 mL de solução de Follin Ciocalteau a 10% (v/v) (Sigma-Aldrich). Os tubos foram homogeneizados e após repouso de 1 minuto, adicionou-se 2,0 mL de solução saturada de carbonato de sódio a 7,5 % (m/v) (P.A-ACS, Êxodo Científica). A mistura reagente foi homogeneizada e mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz por duas horas. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (modelo UV-5100, Global Trade Technology) a 750 nm, em triplicata, utilizando etanol absoluto (P.A, Êxodo Científica) como branco para ajustar o zero de absorvância. Para o cálculo da determinação de fenólicos totais (expressos em mg AGE/100 g) foi utilizada a equação da reta da curva analítica padrão construída com o ácido gálico (Anexo 2) fazendo-se a correspondência para a absorvância da amostra utilizada para fazer o extrato.

#### **4.2.3.3. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro***

##### **4.2.3.3.1. Método de captura de radicais DPPH**

A determinação da capacidade antioxidante via captura de radical livre DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) foi realizada segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007a). A curva analítica padrão de DPPH (Sigma-Aldrich) foi construída por 7 pontos correspondentes a concentração de 10-60  $\mu$ M obtendo-se a equação da reta. Em ambiente protegido da luz foram transferidos 0,1 mL de cada diluição dos extratos para tubos de ensaio contendo 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mM). As amostras foram agitadas em vortex (Vx-28, Warmnest) e lidas em espectrofotômetro (modelo UV-5100, Global Trade Technology) a 515 nm, observando-se a redução da absorbância até sua estabilização, ou seja, quando o valor da absorbância observada no equipamento não apresentou variação de leitura. Para as amostras do presente estudo, a estabilização foi atingida após 1 hora e 40 minutos do início da reação. Para o controle foi usado 0,1 mL de solução controle de metanol (UV/HPLC, Vetec), acetona (P.A, Êxodo Científica) e água em substituição ao extrato e álcool metílico como branco para ajustar o zero de absorbância. Para o cálculo de equivalência de controle e DPPH foi utilizada a equação da reta obtida da curva analítica padrão de DPPH (Anexo 3) e o resultado final da capacidade antioxidante das amostras foi expresso em  $EC_{50}$  posteriormente convertido para g polpa /g DPPH.

#### **4.2.3.3.2. Método de captura de radicais ABTS**

A determinação da atividade antioxidante via radical 2,2-AZINO-BIS (3-ethylbenzo- thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) foi realizada segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007b). A partir de uma solução padrão de 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (trolox) (Sigma-Aldrich) a 2 mM, procedeu a diluição da mesma, em álcool etílico de modo a determinar a curva analítica padrão utilizada na análise. Esta curva foi composta por 5 pontos correspondentes as concentrações de 100-2000  $\mu$ M. Em ambiente protegido da luz e em triplicata foram adicionados 0,03 mL de cada diluição de extrato com 3,0 mL do radical ABTS $\cdot^+$  (Sigma-Aldrich). Os tubos foram homogeneizados em vortex (VX-28, Warmnest) e lidos espectrofotometricamente (modelo UV-5100, Global Trade Technology) a 734 nm após deixar em temperatura ambiente por 6 minutos a fim de completar a reação. Foi utilizado álcool etílico (P.A,

Êxodo Científica) como branco para ajustar o zero de absorvância. Para a determinação da capacidade antioxidante das amostras utilizou-se a equação da reta obtida da construção da curva analítica padrão de trolox (Anexo 4) e o resultado final foi expresso em  $\mu\text{M}$  de trolox/g de polpa.

#### **4.2.3.3.3. Método FRAP**

A determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rufino et al. (2007c) adaptada para microescala. A curva analítica padrão foi construída a partir da diluição de uma solução de sulfato ferroso 2 mM (P.A, Dinâmica), em água destilada, de modo a obter 6 pontos correspondentes as concentrações de 125-500  $\mu\text{M}$ . Em uma microplaca de fundo chato foram adicionados 0,025 mL de cada diluição dos extratos e 0,230 mL de reagente FRAP (Sigma-Aldrich). A microplaca foi incubada em ambiente escuro por 30 minutos a 37°C. Após este tempo, foi realizada a leitura a 595 nm em leitor de placa ELISA (EPOCH, Biotek). Para o branco foi utilizado 0,255 mL do reagente FRAP. Para a determinação da capacidade antioxidante das amostras pelo método FRAP utilizou-se a equação da reta obtida da construção da curva analítica padrão de solução de sulfato ferroso (Anexo 5) e o resultado final foi expresso em  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g de polpa.

#### **4.2.4. Análises microbiológicas da polpa de macaúba**

Para análise microbiológica da polpa de macaúba, foram adotados os padrões e metodologias definidas pela resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) seguindo os requisitos exigidos para polpas de frutas uma vez que não existe padrão específico para polpa de macaúba. As análises realizadas foram contagem de coliformes totais e termotolerantes e pesquisa de *Salmonella sp.*

#### **4.2.5. Padronização e obtenção do inóculo para elaboração das bebidas fermentadas a base extrato hidrossolúvel de soja (EHS).**

#### **4.2.5.1. Determinação do número de células viáveis nas culturas liofilizadas para padronização do inóculo**

Para garantir a padronização de cada cultura microbiana liofilizada utilizada para produção das bebidas fermentadas a base de EHS foram realizadas contagens do número de células viáveis por grama de células liofilizadas (UFC/g) de cada uma das culturas seguindo metodologia descrita por Antunes (2004). A contagem inicial foi determinada pesando 0,1 g de cada cultura láctea e suspendendo-as em 9,9 mL de água peptonada (0,1%) estéril. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 minutos para completa dispersão das células. A partir da diluição obtida ( $10^{-2}$ ) procedeu-se as diluições decimais seriadas. Foi utilizado o meio MRS Agar (Acumedia, Lansing, USA) para contagem das células das culturas lácteas. Foi utilizado a técnica do plaqueamento em profundidade e as placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 48 horas em microaerofilia.

#### **4.2.5.2. Preparo das culturas microbianas para obtenção do inóculo padronizado**

##### **4.2.5.2.1. Cultura liofilizada YF-L812**

Foram preparados 500 mL de EHS reconstituído a 8%, tratado termicamente a 121 °C por 15 minutos e resfriado a 43 °C. Asepticamente, dissolveu-se todo o conteúdo do envelope de YF-L812, dosagem para 500 litros, com auxílio de agitador magnético por 5 minutos neste meio. Após completa dissolução, o meio foi incubado a 42 °C por 30 minutos para hidratação e ativação das células. Em seguida, foram resfriados a temperatura ambiente e distribuídos em tubos falcon estéreis e congelados a -18 °C até o momento do uso. Após esse preparo, obteve-se inóculo com concentração  $10^7$  UFC/mL. Para o preparo das bebidas fermentadas, os tubos foram descongelados a temperatura ambiente e adicionados diretamente na mistura base das bebidas na proporção de 3,0% em relação ao volume produzido (BERNAL-MONDRAGON,2004).

#### **4.2.5.2.2. Cultura liofilizada LA-5**

Para o preparo do inóculo, foram pesados assepticamente 1,0 g da cultura liofilizada e adicionada em 10 mL de caldo MRS estéril (Acumedia, Lansing, USA). A amostra foi homogeneizada e incubada em BOD a  $37\pm 1$  °C por 24 horas. Após a primeira incubação, a amostra foi adicionada em 1 litro de caldo MRS estéril novamente e incubada por mais 24 horas a mesma temperatura. Decorrido a segunda incubação, a amostra foi centrifugada a  $2.325 \times g$  durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa de células ressuspendida com água peptonada tamponada 0,1% estéril. As etapas de centrifugação e ressuspensão foram realizadas por mais duas vezes. Após esta etapa, a suspensão contendo as células foi dividida em tubos falcon, adicionadas de glicerol 20% e congeladas a -18 °C até o momento do uso. Após esse preparo, os inóculos congelados apresentaram contagem de  $10^7$  UFC/mL. Para o preparo das bebidas fermentadas contendo a mistura dos inóculos (YF-L812 e LA-5) os tubos foram descongelados a temperatura ambiente e adicionados diretamente na mistura base das bebidas na proporção de 4,0% em relação ao volume produzido (BERNAL-MONDRAGON, 2004)

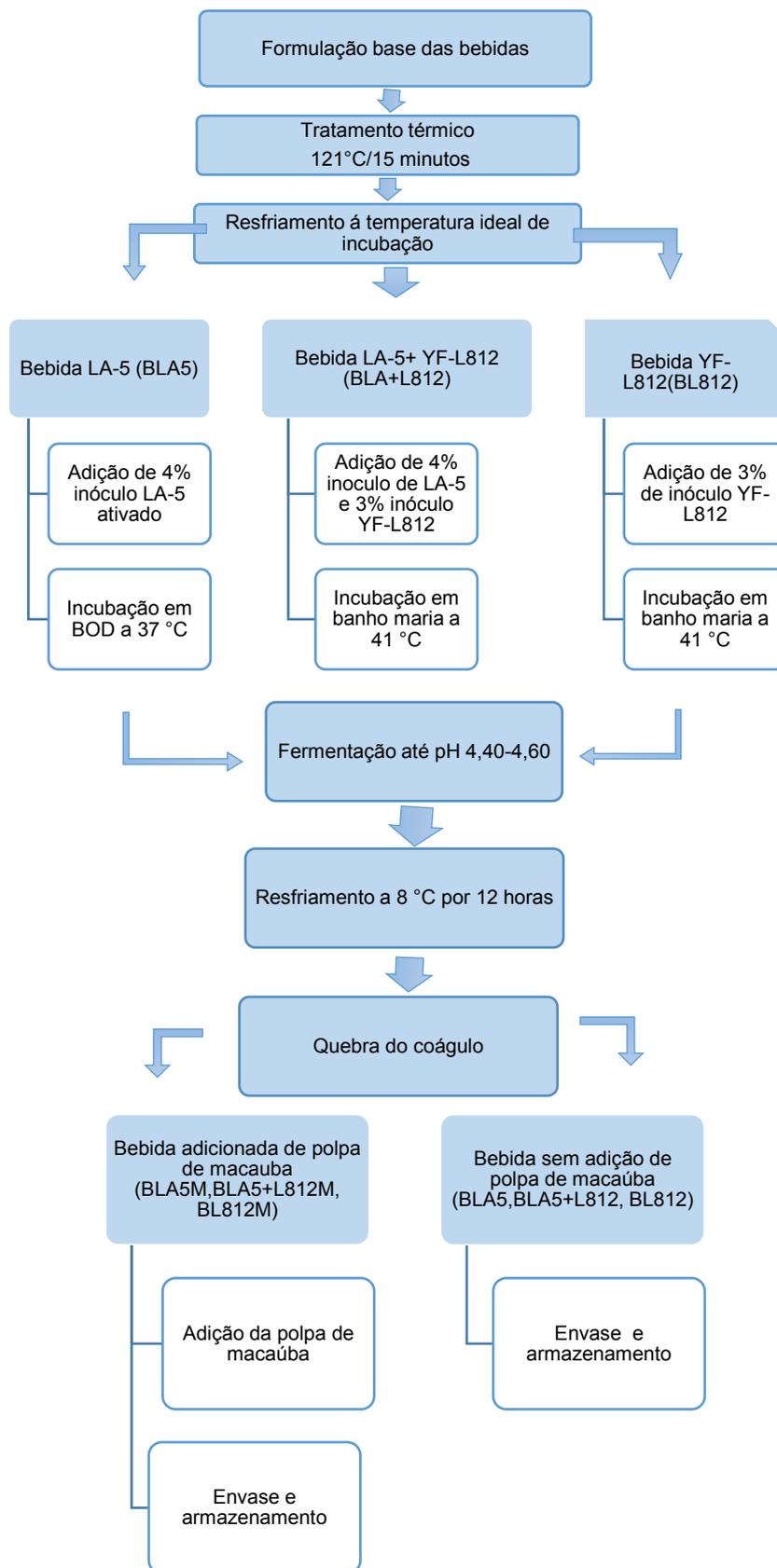
#### **4.2.5.3. Ativação do inóculo para uso na produção da bebida fermentada por *L. acidophilus* (inóculo LA-5)**

Na produção da bebida fermentada onde o *L. acidophilus* (inóculo LA-5) foi usado como cultura única fez-se necessário uma pré-ativação do inóculo antes da sua utilização a fim de diminuir o tempo gasto para a fermentação. Para isso, 1 mL do inóculo congelado foi adicionado assepticamente em 10 mL de EHS 8% estéril e incubado a 37°C/24 horas. Após esse período, o inóculo ativado foi adicionado diretamente na mistura base de fermentação da bebida na proporção de 4% em relação ao volume produzido (BERNAL-MONDRAGON, 2004).

#### **4.2.6. Elaboração das bebidas lácteas fermentadas com diferentes culturas lácteas**

A metodologia de fabricação das bebidas fermentadas a base de EHS foi adaptada de Mondragón-Bernal (2004) e Riquette (2013). O fluxograma de processamento está apresentado na Figura 8. Foram realizadas três repetições para cada tipo de bebida elaborada considerando o mesmo lote de EHS, açúcar e amido modificado para todos os tratamentos. As bebidas foram identificadas de acordo com o inóculo utilizado conforme descrito na Tabela 2. Para a formulação base das bebidas foram utilizados EHS em pó reconstituído a 6% em água potável (conforme indicação do fabricante) à temperatura ambiente, açúcar cristal a 8% (definido como grau de doçura sensorialmente mais aceito em estudos com consumidores) (BEHRENS, 2002; BERNAL-MONDRAGON, 2009) e 0,5% de amido modificado para melhorar textura e evitar a sinérese (MANZANO et al., 2008). O amido modificado foi misturado ao açúcar e ambos foram adicionados em cerca de 1/3 do EHS reconstituído e aquecido a 70 °C para evitar a formação de grumos pelo amido. Após a dissolução dos ingredientes, adicionou-se o restante do EHS 6% e submeteu-se ao tratamento térmico a 121 °C por 15 minutos em autoclave. As amostras foram resfriadas de acordo com a temperatura de incubação (Figura 1) e incubadas até atingir pH 4,40 - 4,60. Em seguida foram resfriadas a 8 °C e mantidas nesta temperatura por 12 horas. O coágulo resfriado foi quebrado manualmente em movimentos lentos. As amostras sem polpa foram envasadas logo após a quebra do coágulo e as amostras que receberam adição da polpa de macaúba foram envasadas logo após a adição. Ambos os processos (com e sem polpa) foram envasados em embalagens plásticas previamente higienizadas (solução clorada 50 ppm por 20 minutos) e armazenadas a  $7 \pm 1$  °C por 28 dias (BERNAL-MONDRAGON,2009; RIQUETTE,2013).

**Figura 8-** Fluxograma de processamento das bebidas fermentadas à base de EHS



Fonte: o autor, 2017.

**Tabela 2-** Microrganismos presentes nas culturas utilizadas e codificação adotada para cada tipo de bebida.

Cultura comercial utilizada	Microrganismos presentes	Codificação adotada	
		Bebida sem macaúba	Bebida com macaúba
LA-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> linhagem LA5	BLA5	BLA5M
YF-L812	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	BL812	BL812M
LA-5 + YF-L812	<i>Lactobacillus acidophilus</i> linhagem LA5, <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp <i>bulgaricus</i>	BLA+L812	BLA+L812M

Fonte: o autor, 2017

#### 4.2.7. Preparo e adição da polpa de macaúba

Devido às características físicas (oleosa e fibrosa) e da acentuada atividade enzimática capaz de alterar a coloração inicial da fruta (escurecimento enzimático decorrente da ação de polifenoloxidase) não foi possível incorporá-la diretamente nas bebidas prontas. Desta forma, fez-se necessário realizar uma preparação prévia da polpa *in natura* da fruta de forma a obter um preparado homogêneo e estável para ser adicionado às bebidas fermentadas após a finalização do processo de fermentação. Para evitar o escurecimento enzimático, a polpa *in natura* previamente preparada conforme descrito no item 4.2.1, foi descongelada a temperatura ambiente e colocada em solução de ácido cítrico a 0,1%, de grau alimentício (Cori Ingredientes), por 10 minutos em bandejas plásticas limpas e com tampa. Após esse período foram lavadas em água potável filtrada por 30 segundos e centrifugadas em centrifuga manual até remoção de toda a água. A polpa *in natura* foi adicionada de água filtrada potável, na proporção de uma parte de fruta (g) para cinco partes de água (g). A mistura foi homogeneizada com auxílio de mixer (Oster,2616-057), obtendo-se assim a polpa de fruta diluída (15,25% de fruta *in natura*) pronto para uso. Esta polpa diluída foi utilizada imediatamente após seu

preparo. Como não há legislação específica que define os padrões mínimos para “polpa de macaúba”, optou-se por utilizar processamento mínimo necessário para que as características da fruta *in natura* fossem preservadas. Nas bebidas fermentadas à base de EHS adicionadas de polpa de macaúba, foram adicionados 28% da polpa de fruta diluída em relação ao volume total da bebida pronta. Essa quantidade foi definida após pré-testes que mostraram a quantidade necessária para que o produto apresentasse cor e sabor característicos da fruta e não houvesse separação de fase.

#### **4.2.8. Análise físico-química das bebidas fermentadas a base de EHS**

As determinações de umidade, proteínas, cinzas, fibra alimentar e carboidratos de todas as bebidas fermentadas foram feitas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1.1. A determinação de lipídeos foi realizada pelo método de Bligh Dyer (1959), usando clorofórmio (P.A, Proquimios) e metanol (UV/HPLC, Vetec) como solvente extrator.

#### **4.2.9. Análises microbiológicas das bebidas fermentadas a base de EHS**

Para o controle microbiológico, foram adotados os padrões e metodologias definidos pela Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que estabelece os padrões microbiológicos para todos os tipos de alimentos, seguindo-se especificamente os padrões determinados para produtos à base de soja. As análises realizadas para todas as bebidas foram contagem de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Salmonella sp* e contagem de *B. cereus*.

#### **4.2.10. Avaliação da vida de prateleira das bebidas fermentadas à base de EHS**

A viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* utilizado na produção das bebidas BLA5, BLA5M, BLA5+L812 e BLA5+L812M foi determinada para verificar a resistência e o comportamento do probiótico no produto final durante o armazenamento refrigerado e a possível alegação de propriedade funcional e de

saúde em relação a presença de probióticos, conforme os termos definidos pela ANVISA (BRASIL, 2002; BRASIL 2016). Para a bebida fermentada apenas com a cultura de iogurte (BL812 e BL812M), apesar da inexistência de legislação específica para bebidas fermentadas à base de EHS, a viabilidade foi determinada e comparada com os demais tratamentos. O padrão adotado foi o mesmo definido para bebidas lácteas fermentadas (BRASIL, 2005; BRASIL, 2007). Para cada tratamento, a viabilidade foi determinada no dia da produção, dia 0, e nos 7 °, 14 °, 21 ° e 28 ° de armazenamento. Além das análises de viabilidade, foram feitas as determinações de pH e acidez titulável das bebidas durante esses mesmos períodos (; BERNAL-MONDRAGON,2009; RIQUETTE,2013).

#### **4.2.10.1. Viabilidade das culturas lácteas no produto final**

Para a determinação da contagem das células viáveis nas bebidas fermentadas a base de EHS, uma alíquota de 25 g da amostra foi diluída em 225 mL água peptonada tamponada 0,1% ( $10^{-1}$ ). Realizou-se diluições seriadas das amostras seguido do plaqueamento em profundidade. As placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C em BOD por 48 horas em microaerofilia.

Para a bebida fermentada com o inóculo LA-05+YF-L812 (*L. acidophilus*, *S. termophilus* e *L. bulgaricus*) utilizou-se o meio MRS-BILE (Difco, França) que permite recuperar apenas as células de *L. acidophilus*. Para avaliar a seletividade do meio para *L. acidophilus* na presença da cultura mista (YF-L812) foram realizados ensaios descritos por Vinderola & Reinheimer (2000) com adaptações de Pereira (2012) (sem adição de cisteína), obtendo recuperação de 97% para *L. acidophilus* e inibição total da cultura mista YF-L812.

Para as demais bebidas a enumeração foi realizada utilizando o meio MRS (Acumedia, EUA) segundo metodologia descrita por Bernal-Mondragon (2009) com adaptações.

#### **4.2.10.2. Determinação do pH e acidez titulável no produto final**

A determinação dos valores de pH em todas as bebidas foi realizada por leitura direta em potenciômetro modelo MPA210 (MS Tecnopon, Brasil). A acidez

expressa em porcentagem de ácido lático foi determinada pelo método de titulação com solução de NaOH 0,1 N (P.A, Dinâmica) padronizada usando como indicador a solução de fenolftaleína a 1% (P.A-ACS, Êxodo Científica) (BRASIL, 2006).

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para as determinações físico químicas e microbiológicas das polpas de macaúba *in natura* foi usado Teste T ( $p < 0,5$ ) para comparação das médias e para as mesmas determinações das formulações de todas as bebidas foi realizada Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey ( $p < 0,5$ ) para comparação das médias, ambas utilizando software Sisvar 5.6 (DEX/UFLA). Na avaliação da vida de prateleira, para os experimentos realizados com os dois tipos de bebidas (com e sem adição de polpa da macaúba), nos quais foram estudados 3 diferentes tipos de tratamentos, dois processos e dias de estocagem, o delineamento adotado foi em parcelas subdivididas seguida de teste de Duncan ( $p < 0,5$ ) para comparação de médias utilizando software Excel 2016 (MICROSOFT OFFICE). Todos os experimentos foram realizados em triplicata exceto as análises microbiológicas que foram realizados em duplicata.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Obtenção da polpa de macaúba *in natura*

Os resultados relacionados à obtenção da polpa de macaúba estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3-** Rendimento obtido na obtenção de polpa de macaúba.

<b>Amostra</b>	<b>Peso da fruta integral (kg)</b>	<b>Peso de polpa (mesocarpo) obtida (kg)</b>	<b>Peso resíduo (epicarpo, endocarpo e amêndoa) e perdas obtidos (kg)</b>
LOTE 1	14,60	6,07	8,53
LOTE 2	15,25	6,13	9,12

Fonte: o autor, 2017.

A macaúba possui o mesocarpo fibroso fortemente aderido ao endocarpo e sua grande oleosidade são uma das principais dificuldades na despolpa (manual ou mecânica) dos frutos (ZANATTA, 2015). Em nosso estudo, apesar da dificuldade encontrada, após a despolpa dos frutos fornecidos pela Cooper Riachão, obtivemos 6,07 kg (41,58%) e 6,13 kg (40,20%) de parte comestível formada pelo mesocarpo para Lote 1 e Lote 2, respectivamente. Esses valores foram superiores aos relatados por Almeida et al. (1998), que obtiveram 27,0% de polpa nos frutos coletados na região de Jaboticatubas (MG). Ciconini (2012) descreve em seu estudo que, na macaúba, o mesocarpo representa cerca de 40,0% da composição da fruta, valores muito próximos aos encontrados em nosso trabalho. Em amostras provenientes de Dourados (MS) e Presidente Epitácio (SP), Argandoña-Sanjinez (2011) encontrou mesocarpo representando cerca de 42,0% do fruto inteiro, corroborando os valores encontrados no presente estudo. Entretanto, o estudo realizado por Almeida (2014) que avaliou a proporção casca/polpa na macaúba cultivada no Norte de Minas Gerais obteve 44,1% correspondente ao mesocarpo dos frutos avaliados; valor este um pouco superior ao presente trabalho. As variações e diferenças encontradas entre os estudos podem ser explicadas pela influência que a fertilidade do solo, manejo agrícola, grau de maturação do fruto

exercem sobre as características biométricas e influenciam a produtividade da macaúba. Apesar da dificuldade tecnológica na obtenção da polpa de macaúba, os rendimentos obtidos neste e nos demais estudos demonstram o grande potencial de aplicação da polpa e sua viabilidade, fazendo-se necessário e viável o desenvolvimento de técnicas mais eficientes na sua obtenção.

## 6.2. Análises Físico-químicas polpa de macaúba

### 6.2.1. Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal estão expressos em base seca (Tabela 4).

**Tabela 4** - Composição centesimal (g/100 g) das polpas de macaúba.

<b>Composição centesimal (g/100g)</b>	<b>LOTE 1 (g/100g)</b>	<b>LOTE 2 (g/100g)</b>
Proteínas	6,99 <sup>a</sup> ± 0,07	7,12 <sup>a</sup> ± 0,07
Lipídios	33,28 <sup>a</sup> ± 2,28	32,68 <sup>a</sup> ± 1,19
Cinzas	5,13 <sup>a</sup> ± 0,26	5,17 <sup>a</sup> ± 0,26
Fibra alimentar total	47,13 <sup>a</sup> ± 0,94	48,14 <sup>a</sup> ± 0,69
Fibra alimentar solúvel	15,65 <sup>a</sup> ± 0,65	16,08 <sup>a</sup> ± 0,67
Fibra alimentar insolúvel	30,42 <sup>a</sup> ± 1,53	31,99 <sup>a</sup> ± 1,35
<sup>1</sup> Carboidratos	7,47	6,90
<sup>2</sup> Valor calórico total (Kcal/100g)	140,08 ± 6,13	135,73 ± 9,55

Valores médios ± desvio padrão (n=3) seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo Teste T ( $\alpha = 0,05$ ).<sup>1</sup> Teor de carboidratos calculados por diferença.<sup>2</sup> Valor calórico calculado segundo conversão: proteínas 4 Kcal/g, carboidratos 4 kcal/g, lipídeos 9 kcal/g. Fonte: o autor, 2017.

No presente estudo, não houve diferença significativa entre os lotes analisados para nenhum dos componentes investigados. Isso pode ser explicado pelo fato das amostras serem provenientes do mesmo local de cultivo, recebendo assim as mesmas condições de solo, manejo, luminosidade e chuvas durante seu desenvolvimento. Em relação aos teores de umidade, os valores encontrados (60,80% para o lote 1 e 61,26% para o lote 2) são superiores aos relatados na

maioria dos estudos. Farias (2010) encontrou valores de 46,4% de umidade para amostras do Norte de Minas Gerais e 49,1% para amostras do Ceará. Argandoña-Sanjinez (2011) relata valores de 52,08% de umidade para polpas de Presidente Epitácio e 51,13% para amostras de Dourados (MS). Entretanto, em um estudo realizado por Ciconini (2011) relatou-se teor de umidade variando de 49,06% a 63,00%, indicando a grande variabilidade nos teores de umidade no fruto. Os frutos de macaúba analisados no presente estudo foram coletados em período atípico de frutificação com maior incidência de chuvas. Esta condição climática influencia diretamente o teor de umidade dos frutos, uma vez que, por serem coletados sob o solo, ocorre maior exposição à umidade e conseqüentemente maior absorção de água pelo fruto caído. Além disso, a forma de armazenamento dos frutos na cooperativa (tambores fechados ou amontoados sob o piso) contribui para a elevação da umidade dos frutos analisados. Desta forma, o teor de umidade encontrado para o estudo em questão foi maior e dentro do esperado. Entretanto, devido à esta condição, o processamento rápido após a colheita foi necessário para evitar a deterioração dos mesmos.

Os teores proteicos das amostras de polpa de macaúba dos Lote 1 e Lote 2 foram de 6,99% e 7,12%, respectivamente. Silva et al. (2008) encontrou 4,20% de proteínas em polpa de macaúba proveniente de Goiânia (GO), valor abaixo aos encontrados em nosso estudo. Relatos na literatura trazem teores proteicos para polpa de macaúba de diferentes localidades que variam de 1,18% a 4,20% (RAMOS, 2007; SILVA, 2008; LIRA et al., 2013), valores também menores que os encontrados para as amostras analisadas. Sabendo-se da importância da ingestão de proteínas para manutenção da saúde humana, a macaúba pode contribuir para o enriquecimento desta ingestão, uma vez que sua polpa apresenta valores de proteínas semelhantes ao encontrado no arroz integral cozido (8,7%) e batata inglesa cozida (8,8%) e superiores as frutas comerciais usadas na alimentação humana, como banana prata (4,63%) e maçã fuji (1,91%) (TACO, 2011).

Em relação aos teores de lipídeos, foram encontrados 33,28% e 32,68% para os Lote 1 e Lote 2 respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos reportados por Lira et al. (2013) que obteve teores de 32,76% e 32,05% para duas espécies de macaúba analisadas e superiores aos encontrados por Ramos et al. (2008) que obteve resultados de 17,32% para lipídeos.

Em relação ao teor total de minerais, os Lotes 1 e 2 analisados apresentaram teores de 5,13% e 5,17% para cinzas, respectivamente. Estes valores são superiores aos reportados por Silva et al. (2008) que encontrou teores de 2,71% e semelhantes aos reportados por Aragão (2014), que encontrou 4,40% em amostras *in natura* de macaúba oriundas de Petrolina (PE).

As polpas analisadas apresentam valores expressivos para fibra alimentar total (47,13% e 48,14%). Esses resultados são superiores aos encontrados por Ramos et al. (2008) que obteve resultados de 29,27% para fibras. Ainda em relação ao teor de fibras, as amostras do presente estudo apresentaram maior valor quando comparados ao estudo de Silva et al. (2008). O teor de fibra alimentar encontrado nas amostras de macaúba deste e de outros estudos, por estar acima 6,0 g na porção de 45 g (1 unidade) classificam este fruto como alimento alto conteúdo de fibras, podendo fornecer cerca de 32% da ingestão diária recomendada deste componente na dieta humana (BRASIL,2012).

Os teores de carboidratos das amostras de macaúba para o lote 1 e lote 2 foram de 7,47% e 6,99% respectivamente. Esses teores encontrados nas amostras analisadas são menores que os relatados na literatura. Segundo a Tabela Taco (2011), a macaúba crua *in natura* apresenta teores de carboidratos de 23,76%. Silva et al. (2008) encontrou valores de 53,38% para carboidratos; valores muito superiores ao relatado pela TACO e aos encontrados neste estudo. O teor de umidade elevado nas amostras e o grau de maturação podem ser responsáveis pelo baixo valor dos carboidratos encontrados.

Além disso, devido ao seu baixo valor energético (140,08 kcal e 135,73 kcal), a polpa pode ser usada em diversas preparações como sucos, tortas, sorvetes ou para produção de farinha de macaúba, ampliando assim o uso nas preparações alimentares.

O estudo da composição química de espécies nativas contribui para uma melhor compreensão entre nutrição e biodiversidade, especialmente em termos de produção e processamento de alimentos para a alimentação humana (FERNANDES et al., 2010). O cerrado brasileiro apresenta grande diversidade de espécies frutíferas que podem contribuir na alimentação humana fornecendo macro e micronutrientes como fibras, carboidratos, lipídeos e proteínas. A macaúba apresenta composição química com grande potencial nutricional e pode ser usada

no desenvolvimento de produtos alimentícios e assim contribuir para melhorar a qualidade da alimentação das famílias residentes no cerrado, que frequentemente se encontram em vulnerabilidade social (RODRIGUES, 2005; VIEIRA et al., 2006; HAMACEK, 2012). Além disso, a macaúba oferece total aproveitamento do resíduo gerado como fonte de energia em fornos e usinas.

### 6.2.2. Determinação de Carotenoides Totais e Compostos Fenólicos Totais

Os resultados das determinações de carotenoides totais e compostos fenólicos totais estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5-** Carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ ) e Compostos fenólicos totais (mg GAE/100g) das polpas de macaúba.

Amostra	Carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ )	Compostos fenólicos totais (mg GAE/100g)
LOTE 1	24,70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,70	256,99 <sup>a</sup> $\pm$ 1,48
LOTE 2	25,20 <sup>a</sup> $\pm$ 0,40	225,79 <sup>b</sup> $\pm$ 2,22

Valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=3) seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste T ( $\alpha = 0,05$ ). Fonte: o autor, 2017.

Os valores dos teores de carotenoides totais determinados nos lotes 1 e 2 foram  $24,70 \pm 0,70 \mu\text{g/g}$  e  $25,20 \pm 0,40 \mu\text{g/g}$  respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre os lotes das amostras analisadas. Isso pode ser justificado pelo fato das amostras serem coletadas na mesma época, no mesmo local e com o grau de maturação semelhante.

Na macaúba, assim como em outros frutos, o grau de maturação é um dos fatores que afetam decididamente a composição em carotenoides (RODRIGUES-AMAYA, 2008). Entretanto, os valores encontrados neste estudo são menores que os relatados por Castilho et al. (2015), que encontraram teor de  $58,51 \mu\text{g/g}$  de carotenoides em polpa de macaúba proveniente do estado de Goiás. Rocha et al. (2013) reporta valores de  $132,65 \mu\text{g}/100\text{g}$  para polpa de macaúba proveniente do cerrado piauiense, valores menores que os encontrados no presente estudo.

As diferenças encontradas podem ser decorrentes dos métodos de extração utilizados, assim como as condições de cultivo, grau de maturação, processamento e armazenamento das amostras. No presente estudo, as amostras analisadas

estavam congeladas (120 dias) enquanto nos demais, as amostras foram analisadas *in natura*. Ressalta-se que os teores de carotenoides encontrados para macaúba neste estudo são semelhantes aos de frutas tropicais tais como o mamão colombo (19,22 µg/g) e manga americana (28,06 µg/g) reportados por Malaterre-September et al. (2016).

O teor de compostos fenólicos totais foram de 256,99 e 225,79 mg AGE/100g para os lotes 1 e 2 respectivamente. A diferença significativa observada nos teores de composto fenólicos totais entre os dois lotes analisados podem estar relacionadas à diferença na exposição a agentes causadores de estresse entre as colheitas. A concentração de compostos fenólicos varia em decorrência das condições geográficas e ambientais e fatores fisiológicos.

Os valores encontrados neste estudo são cerca de 4 vezes maiores que os reportados por Rocha et al. (2013) que encontrou teores de compostos fenólicos totais de 60,85 mg AGE/100 g para macaúba proveniente do cerrado piauiense. As discrepâncias nos valores de teores dos compostos fenólicos, segundo Soares (2008), podem ser influenciadas por diversos fatores, tais quais maturação, espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento das frutas. Uma das formas de síntese de compostos fenólicos derivam do metabolismo secundário das plantas que são ativados pela exposição ao estresse. Desta forma, a exposição aos agentes causadores deste (fatores nutricionais, exposição aos raios UV, ataque de patógenos) podem ter sido diferentes entre os lotes.

A peculiaridade metodológica relacionada ao solvente extrator e aos fenólicos usados como padrão para a quantificação dos compostos fenólicos também pode contribuir para as diferenças observadas. No estudo de Rocha et al. (2013) a extração foi realizada com solução alcóolica e aquosa, enquanto no presente estudo utilizou-se metanol e acetona. O teor de fenólicos totais encontrado neste estudo é semelhante aos encontrados para outras frutas como murici (334,37 mg AGE/100g), uva niágara rosa (207 mg AGE/100g) e dos frutos verdes de *Syagrus romanzoffiana* (259,40 mg AGE/100g). Também são semelhantes aos teores relatados por Moo-Huchin et al. (2015) em frutas tropicais mexicanas como caju vermelho (287,28 mg AGE/100g), nance amarela (240,76 mg AGE/100g), nance vermelha (266,26 mg AGE/100g) e mamoncillo (295,35 mg AGE/100g). Os

teores de fenólicos encontrados para macaúba são superiores aos encontrados para amora (118,940 mg AGE/100g); uva (117,1 mg AGE/100g); goiaba (83,0 mg AGE/100g); morango (132,1 mg AGE/100g); abacaxi (21,7 mg AGE/100g); graviola (84,3 mg AGE /100g); cupuaçu (20,5 mg AGE /100g) e maracujá (20,0 mg AGE/100g) (KUSKOSKI et al., 2006, SOUZA et al., 2012). Coimbra (2013) analisando teores de fenólicos totais em óleo de polpa da macaúba, encontrou teores de 221 mg AGE/100g, valor este semelhante ao encontrado no presente estudo.

A importância do estudo da determinação dos carotenoides e compostos fenólicos está no fato destes compostos apresentarem potencial de atividade antioxidante no corpo humano. O  $\beta$ -caroteno é o principal pro vitamínico A e sua ação antioxidante está na capacidade de neutralizar radicais livres e outras espécies reativas como o oxigênio *singlet*. Além disso, a ingestão de alimentos que forneçam esse componente contribui para melhora da qualidade nutricional das preparações alimentícias.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deriva de sua capacidade de formar radicais intermediários estáveis, impedindo a oxidação. Além disso, atuam como doador de hidrogênio ou elétrons, reagindo com os radicais livre (SILVA et al., 2010; DAMODARAN et al., 2008). A macaúba possui potencial de utilização na alimentação humana uma vez que os resultados encontrados para os componentes em questão são satisfatórios. A inserção da macaúba nas preparações ou seu consumo *in natura* poderá fornecer quantidades significativas de carotenoides, principalmente para populações em vulnerabilidade social que residem nos biomas onde ela está presente. Além disso, a macaúba pode trazer benefícios uma vez que possui quantidades expressivas de compostos fenólicos com potencial atividade antioxidante.

### **6.3. Determinação da Capacidade Antioxidante *in vitro* da polpa de macaúba**

A determinação da atividade antioxidante das amostras de macaúba foi avaliada pelos métodos de captura do radical livre DPPH, ABTS e pela redução de íons ferro (FRAP) e os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Capacidade antioxidante *in vitro*.

<b>Amostra</b>	<b>DPPH (g fruta/g DPPH)</b>	<b>ABTS (<math>\mu\text{M}</math> de trolox/g fruta)</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{M}</math> Sulfato Ferroso/g fruta)</b>
LOTE 1	7310,76 <sup>a</sup> $\pm$ 9,44	6,27 <sup>a</sup> $\pm$ 0,51	7,57 <sup>a</sup> $\pm$ 0,77
LOTE 2	9450,43 <sup>b</sup> $\pm$ 0,02	3,21 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04	6,42 <sup>a</sup> $\pm$ 0,50

Valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=3) seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste T ( $\alpha = 0,05$ ). Fonte: o autor, 2017.

A determinação foi realizada de acordo com a curva analítica padrão de DPPH (Anexo 3). Por este método, foram encontrados valores de 7310,76 g de fruta/ g DPPH e 9450,43 g fruta/g DPPH para lotes 1 e 2 respectivamente. As amostras apresentaram diferença significativa entre si, onde o lote 1 apresentou maior atividade antioxidante para o método avaliado. Os valores encontrados nesse estudo são semelhantes aos relatados por Rufino et al. (2010) para caju (7142 g fruta/ g DPPH) e para cajá 9397 (g fruta/ g DPPH). Santos (2014) relata valores de 7775,45 g fruta/g DPPH para mirtilo e 6065,68 g fruta/g DPPH para cereja.

Quanto à captura do radical ABTS (determinada em função da curva analítica padrão de Trolox, demonstrada no Anexo 4), os resultados encontrados foram 6,27  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta para o lote 1 e 3,21  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta para o lote 2, com diferenças significativas entre os lotes, conforme demonstrado na Tabela 5. No estudo realizado por Zanatta (2015) as amostras de polpa de macaúba avaliadas apresentaram atividade antioxidante variando de 12,62 a 50,88  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta, valores muito superiores aos encontrados em nosso estudo. Os valores obtidos para a macaúba lote 1 são semelhantes ao umbu (6,3  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta) e ao cajá (7,8  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta) relatados por Rufino et al. (2010) e ao mirtilo (5,88  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta) relatados por Souza et al. (2014). Para o lote 2, o valor se assemelha ao encontrado para abacaxi (2,62  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta), manga (2,70  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta) e maracujá (3,34  $\mu\text{M}$  de trolox/g fruta) relatados por Prado (2009).

As diferenças encontradas na capacidade antioxidante dos lotes analisados pelos métodos DPPH e ABTS podem ser explicadas pela diferença da concentração de compostos bioativos. Canuto et al. (2010) constatou em seu estudo que a capacidade antioxidante das frutas analisadas estava relacionada ao

teor de compostos bioativos presente. Quanto maior o teor destes compostos, maior é a capacidade antioxidante. A mesma relação foi encontrada por Rufino et al. (2010) e Souza et al. (2012). Dentre os compostos bioativos, os compostos fenólicos e o ácido ascórbico são bons indicadores da capacidade antioxidante da maioria das frutas. Uma vez que o lote 1 apresentou maior teor de compostos fenólicos, a maior capacidade antioxidante foi observada neste em comparação ao lote 2 pelos métodos DPPH e ABTS. Esses dois métodos são baseados na capacidade de sequestro de radicais livres e possuem o mesmo mecanismo de reação, onde os antioxidantes presentes na amostra reduzem e eliminam os radicais presentes, levando ao declínio dos valores de absorvância (SOUZA et al. 2012; LIM et al., 2006).

A avaliação da atividade antioxidante pela redução dos íons ferro (FRAP) apresentou 7,57  $\mu\text{M}$  Sulfato Ferroso/g fruta e 6,42  $\mu\text{M}$  Sulfato Ferroso/g fruta para os lotes 1 e 2 respectivamente. Foram calculados em função da curva analítica padrão de Sulfato Ferroso demonstrada no Anexo 6. Não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras avaliada por esse método. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a capacidade antioxidante da polpa de macaúba pelo método FRAP. Entretanto, comparando com estudos utilizando outras frutas, os valores encontrados são semelhantes aos relatados por Denardim et al. (2015) para butiá (9,32  $\mu\text{M}$  Sulfato Ferroso/g fruta e inferiores aos encontrados para pitanga laranja (33,17  $\mu\text{M}$  Sulfato Ferroso/g fruta), pitanga vermelha (23,43  $\mu\text{M}$  Sulfato Ferroso/g fruta) e araçá (89,09  $\mu\text{M}$  Sulfato Ferroso/g fruta) todas as frutas tropicais analisadas em seu estudo.

O método FRAP possui mecanismo de ação diferente dos outros métodos utilizados. Ele se baseia na redução dos íons ferro pelo composto antioxidante presente. Entretanto, nesse método nem todo redutor hábil para reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  é antioxidante; nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Dessa forma, devido a estes interferentes, não foram encontradas as diferenças significativas entre os lotes 1 e 2 analisados mesmo possuindo diferentes teores de compostos bioativos (compostos fenólicos) (SOUZA, 2012; CLERICI & CARVALHO SILVA, 2011, DUTRA et al., 2017).

Foram utilizados diferentes métodos para determinação da capacidade antioxidante das amostras analisadas uma vez que possíveis variações no

complexo antioxidante de uma matriz alimentar podem fornecer diferentes resultados em cada método.

A determinação da atividade antioxidante em frutas vem sendo destaque em estudos e pesquisas em todo o mundo. As reações envolvendo espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos causam graves danos a membrana celular e provoca alterações de DNA (MADHUKITH & SHAHIDI,2005). As frutas são as principais fontes de antioxidantes naturais e o estudo de seus compostos podem auxiliar no desenvolvimento de alimentos capazes de contribuir no controle das reações. A macaúba avaliada neste estudo apresenta potencial antioxidante semelhante a várias frutas consumidas pela população humana e pode contribuir no enriquecimento nutricional de preparações alimentares. Além disso, por ser uma fruta pouco explorada comercialmente para consumo alimentar, oferece grande possibilidade no desenvolvimento de novos produtos e aumento da renda das comunidades que a exploram.

#### 6.4. Análise microbiológica das polpas de macaúba

Os resultados das análises microbiológicas das polpas de macaúba estão demonstrados na Tabela 7.

**Tabela 7**-Análise microbiológica da polpa de macaúba.

<b>*Pesquisa</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>
Enumeração de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g)	< 3,0	< 3,0
Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> (25g)	Ausência	Ausência

Fonte: o autor, 2017. \*Amostra indicativa.

As amostras de polpa de macaúba avaliadas no presente estudo apresentaram-se dentro dos limites permitidos na Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza padrões microbiológicos para polpas de frutas congeladas, limite máximo de  $5 \times 10^2$  NMP/g (2,7 ciclos log) para coliformes a 45 °C e ausência de *Salmonella sp.* em 25 g do produto independentemente do sabor, da marca e do período de

coleta. Não foram encontradas diferenças em relação as análises microbiológicas para as amostras avaliadas.

A ausência de coliformes termotolerantes e *Salmonella sp* indica que as amostras foram processadas e manipuladas em condições higiênico-sanitárias adequadas. Dantas et al. (2012), em seu estudo abordando qualidade microbiológica de polpas de frutas comercializadas em Campina Grande-PB, encontrou apenas uma amostra dentre as 19 analisadas que apresentou crescimento para coliformes termotolerantes. No estudo feito por Santos et al. (2008), 4,3 % das amostras de polpa de fruta analisadas apresentaram resultado positivo para coliformes a 30°C e dentre estas, 1,70 % foram positivas para coliformes termotolerantes. Porém, ambos estavam dentro do padrão estabelecido pela RDC °12 de 2001.

Em relação à pesquisa de *Salmonella sp*, os resultados são condizentes com os estudos realizados por Feitosa et al. (1999), Nascimento et al. (1999), Bueno et al. (2002) e Santos et al. (2008), que encontraram resultado negativo em 100% das amostras analisadas.

A qualidade microbiológica é um fator fundamental para o desenvolvimento de produtos alimentares. A matéria prima de qualidade garante que os produtos finais atendam os parâmetros desejados de conservação e estabilidade. As amostras de macaúba avaliadas atendem a estes padrões estando em condições higiênico sanitárias para sua aplicação.

#### **6.5. Testes preliminares no desenvolvimento das bebidas fermentadas a base de EHS.**

Testes preliminares para a produção das bebidas foram avaliados quanto à capacidade de fermentação do EHS pela cultura comercial de iogurte (YF-L812) e pela cultura pura de *L. acidophilus* (LA-5) utilizadas neste estudo. Os objetivos dos testes foram verificar o tempo necessário para fermentação da bebida, a quantidade de inóculo padronizado necessária, a estabilidade e os aspectos do gel formado em relação a textura e sinérese e a influência da adição de fontes de açúcares ao meio base de fermentação.

Observou-se que as duas culturas lácteas utilizadas foram capazes de fermentar o meio base para a produção das bebidas à base de EHS. Nas amostras de bebidas onde foram empregadas cultura comercial de iogurte (YF-L812) como inóculo, o tempo necessário para atingir pH= 4,5 foi de aproximadamente 3 horas. Já para as amostras fermentadas por *L. acidophilus*, o tempo foi superior a 20 horas (utilizando inóculo liofilizado) para atingir o mesmo valor de pH. Quando os testes foram conduzidos utilizando inóculo padronizado e ativado (conforme descrito nos itens 4.2.5.2.2 e 4.2.5.3), o tempo foi reduzido para 12 horas. O gel formado nas duas amostras apresentou-se estável, liso e sem presença de grumos. Entretanto, todas as amostras apresentaram sinérese durante o armazenamento, sendo o fenômeno mais pronunciado nas amostras fermentadas pela cultura YF-812.

A adição de outras fontes de açúcares não alterou o tempo de fermentação. Os experimentos foram conduzidos utilizando glicose, sacarose e lactose na proporção de 2,0 %(m/v) e uma amostra controle contendo apenas o EHS.

A quantidade de inóculo (2,0 %) da cultura YF-L812 utilizada nos testes mostraram-se ideais para a fermentação, mantendo boa viabilidade durante o armazenamento refrigerado (7°C por 28 dias). Entretanto, essa mesma quantidade mostrou-se insuficiente quando a cultura de *L. acidophilus* foi utilizada.

A partir destes testes preliminares, os parâmetros de tempo e temperatura de incubação, padronização no uso do inóculo e do meio base usado na fermentação das bebidas à base de EHS, foram definidos e adaptados seguindo metodologias descritas nos estudos de Riquette (2013), Faleiro (2015) e Bernal-Mondragon (2004).

## **6.6. Preparo da cultura liofilizada para fermentação**

### **6.6.1. Determinação do número de células viáveis nas culturas liofilizadas.**

As contagens do número de células viáveis nas culturas liofilizadas foram realizadas de acordo com o item 4.2.5.1. O resultado está demonstrado na Tabela 8.

**Tabela 8-** Contagem de células viáveis nas culturas liofilizadas

<b>Cultura liofilizada</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Contagem (Log UFC/g)</b>
LA-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> cepa LA5	8,13
YF-L812	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	*8,27

Fonte: o autor, 2017. \* Contagem total dos microrganismos presentes.

As culturas liofilizadas utilizadas neste estudo apresentaram contagens semelhantes entre si e valores ligeiramente menores que os relatados por Riquette (2013) e Bernal-Mondrágón (2004) que obtiveram contagens de 9,15 log UFC/mL e 11,30 log UFC/mL respectivamente. As diferenças podem estar relacionadas as variações de tempo e temperatura de armazenamento, transporte e manipulação destas culturas (BERNAL-MONDRAGON,2004). As empresas produtoras declaram contagens mínimas de ~9 log UFC/g a fim de garantir a manutenção das células viáveis frente as condições adversas ocorridas na cadeia de distribuição do produto.

### **6.6.2. Padronização e determinação de células viáveis nas culturas lácteas**

O inóculo de LA-5 foi preparado conforme descrito no item 4.2.5.2.2. Devido a quantidade limitada disponível da cultura liofilizada de LA-5, foi necessário realizar sua propagação celular (repique) antes do uso. Para o inóculo de YF-L812, a propagação celular não foi necessária pois havia quantidades suficientes da cultura liofilizada para o estudo. Este foi preparado segundo o item 4.2.5.2.1. De cada inóculo preparado, foram separadas amostras de 1 mL em tubosplásticos com fundo cônico de 1,5 mL com tampa. Estas foram mantidas nas mesmas condições dos inóculos de trabalho e foram avaliadas, a cada produção, de acordo com item 4.2.5.1. A Tabela 9 apresenta o resultado da contagem dos inóculos de trabalho.

**Tabela 9** – Viabilidade dos inóculos de trabalho ao longo do armazenamento congelado.

Cultura Congela da	Número de células viáveis (Log UFC/mL) dos inóculos de trabalho					
	Dias de armazenamento					
	0	30	60	90	120	160
LA-5	7,78 <sup>a</sup> ±0,02	7,62 <sup>a</sup> ±0,09	7,60 <sup>a</sup> ±0,1	7,27 <sup>b</sup> ±0,03	7,21 <sup>b</sup> ±0,4	7,18 <sup>b</sup> ±0,4
YF-L812	7,86 <sup>a</sup> ±0,03	7,83 <sup>a</sup> ±0,04	7,81 <sup>a</sup> ±0,03	7,80 <sup>a</sup> ±0,02	7,83 <sup>a</sup> ±0,01	7,70 <sup>a</sup> ±0,05

Valores médios ± desvio padrão (n=3) seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste T ( $\alpha = 0,05$ ). Fonte: o autor, 2017.

Os resultados demonstram que o número de células viáveis do inóculo YF-L812 permaneceu constante (sem diferença significativa entre as médias) durante o armazenamento congelado (-18°C) por 160 dias, apesar de terem sofrido redução de aproximadamente um ciclo log em relação ao inóculo liofilizado, conforme demonstrado no item 6.6.1. O inóculo YF-L812 foi armazenado em EHS 8,0 % demonstrando que esta matriz tem efeito protetor sobre as células viáveis durante armazenamento congelado.

O inóculo LA-5 foi armazenado em glicerol 20% uma vez que foi propagado em meio de cultura e posteriormente congelado e nota-se que a partir do 90° dia de armazenamento, a contagem do inóculo LA-5 apresentou declínio significativo em relação ao período anterior. Entretanto, em termos de padrões microbiológicos essa queda não tem efeito significativo uma vez que o número de células viáveis se apresentou dentro da mesma grandeza (~ 7 log UFC/mL) em ambas as amostras analisadas, garantindo a manutenção de mesmo número de células viáveis nos inóculos de trabalho utilizados.

O EHS apresentou grau de proteção contra os efeitos deletérios do frio sobre as células viáveis de YF-L812 durante o armazenamento congelado no período avaliado, podendo substituir matrizes reconhecidamente usadas como o próprio glicerol e o leite desnatado reconstituído (PYAR & PEH, 2011; ZHANG et al., 2012; LEANDRO et al., 2013). Em relação as células viáveis de LA-5, não foi possível

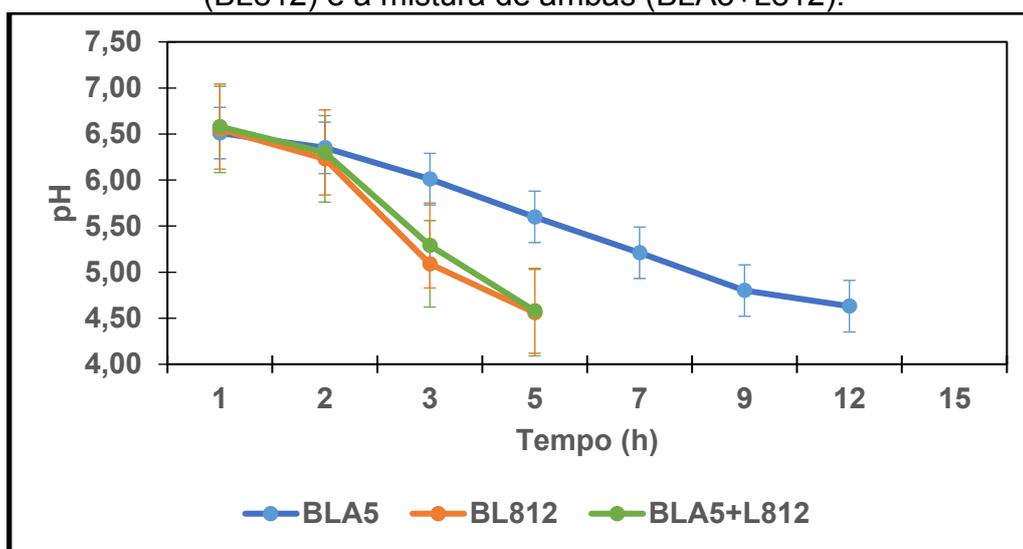
verificar o efeito protetor do EHS devido a quantidade limitada de inóculo disponível para o estudo.

### 6.7. Processo fermentativo das bebidas à base de EHS

Todas as formulações das bebidas foram produzidas conforme fluxograma demonstrado no item 4.2.6.

A Figura 9 apresenta a variação do pH durante o processo de fermentação das bebidas. Na Tabela 10 estão os valores de acidez expressas como % ácido láctico. O pH foi usado como ferramenta do monitoramento. Desta forma, a acidez das bebidas foi determinada apenas no início e final da fermentação.

**Figura 9** - Variação do pH em função do tempo durante fermentação das bebidas por inóculos de *L. acidophilus* (BLA5), cultura mista tradicional para iogurte (BL812) e a mistura de ambas (BLA5+L812).



Fonte: o autor, 2017.

**Tabela 10**- Acidez (% ácido láctico) no início e final da fermentação.

Bebida	Acidez inicial	Acidez final
BLA-5	0,083 <sup>a</sup> ±0,01	0,30 <sup>a</sup> ±0,02
BL812	0,090 <sup>a</sup> ±0,01	0,36 <sup>b</sup> ±0,037
BLA5+L812	0,090 <sup>a</sup> ±0,02	0,34 <sup>b</sup> ±0,048

Valores médios ± desvio padrão (n=3) seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste T ( $\alpha = 0,05$ ). Fonte: o autor, 2017.

Observou-se que a cultura mista de *S.thermophilus* e *L. bulgaricus* (YF-L812) apresentou os menores tempos de fermentação. Usada sozinha ou juntamente com *L. acidophilus*, não foram observadas diferenças no tempo gasto. Na bebida BL812, o tempo gasto foi de 4h e 40 minutos e o pH final alcançado no momento do resfriamento foi de 4,56. Na bebida BLA5+ L812, o pH final foi de 4,58 em 4h e 30 minutos. Os resultados eram esperados uma vez que o agente fermentador em ambas as bebidas era a cultura YF-L812. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de acidez no início e final da fermentação para as bebidas fermentadas pela cultura de YF-L812.

A cultura de *L. acidophilus* apresentou maior tempo quando usada sozinha na fermentação das bebida BLA5. Após 12:00 horas de fermentação, o pH alcançado foi de 4,63 no início do resfriamento. A acidez final também foi significativamente menor que as bebidas BL812 e BLA+812.

As culturas comerciais de iogurte são constituídas pela mistura das espécies de *L. bulgaricus* e *S.thermophilus* que atuam em simbiose durante a fermentação do leite. São homofermentativas, produzindo grande quantidade de ácido láctico no meio. A associação entre essas espécies é responsável pela formação das propriedades reológicas (viscosidade) e sensoriais do iogurte (aroma e sabor) (HATTINGH & VILJOEN, 2001). A legislação brasileira define como “iogurte” o produto fermentado exclusivamente por estas duas espécies, podendo ser adicionado de forma complementar de outras espécies, como probióticos (BRASIL, 2007). A cultura comercial foi capaz de fermentar o EHS, indicando sua capacidade de fermentar outros açúcares presentes. No estudo realizado por Fuchs et al. (2005), os valores de pH encontrados pela fermentação de EHS pela cultura do iogurte estavam na faixa de 4,4 a 4,6 após 6 horas de incubação. A mesma faixa de pH foi encontrada nos estudos realizados por Buono et al. (1990) e Trindade et al. (2001).

Em relação a fermentação por *L. acidophilus*, o tempo necessário para fermentação do EHS foi semelhante ao encontrado por Behrens (2002) e Bernal-Mondragon (2004), atingindo pH de 4,40 em 12 e 14 horas respectivamente.

Apesar das fontes de açúcares fermentáveis na soja serem o fator limitante, Esteves (2011) demonstrou que a *S. thermophilus* e *L. acidophilus* foram capazes

de metabolizar oligossacarídeos como a rafinose presente no EHS, apesar de utilizar preferencialmente as fontes de sacarose e glicose presentes. A diferença entre os tempos de fermentação pode estar associada as necessidades nutricionais maiores requeridas pelo *L. acidophilus* no seu desenvolvimento em comparação com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. O *L. acidophilus* é nutricionalmente exigente, requerendo nutrição complexa como aminoácidos e outras substâncias. Porém seu uso torna-se viável uma vez que os produtos gerados no metabolismo fermentativo do EHS podem proporcionar melhorias sensoriais no produto final (OLIVEIRA, 2009).

#### **6.8. Análise físico química das bebidas fermentadas a base de EHS**

Os resultados da composição físico química das bebidas fermentadas, em base seca, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Composição centesimal das bebidas fermentadas.

<b>Composição centesimal (g/100g)</b>	<b>Bebida LA5M</b>	<b>Bebida LA5</b>	<b>Bebida L812M</b>	<b>Bebida L812</b>	<b>Bebida LA5+L812M</b>	<b>Bebida LA5+L812</b>
Proteínas	29,39 <sup>a</sup> ± 2,49	23,21 <sup>a</sup> ± 1,87	25,21 <sup>a</sup> ± 3,03	21,03 <sup>a</sup> ± 0,98	29,92 <sup>a</sup> ± 0,54	27,47 <sup>a</sup> ± 2,98
Lipídios	14,33 <sup>a</sup> ± 5,69	11,54 <sup>a</sup> ± 1,21	13,71 <sup>a</sup> ± 2,75	12,77 <sup>a</sup> ± 4,69	12,30 <sup>a</sup> ± 3,18	13,49 <sup>a</sup> ± 3,43
Cinzas	2,34 <sup>a</sup> ± 0,47	1,80 <sup>a</sup> ± 0,27	2,38 <sup>a</sup> ± 0,37	1,70 <sup>a</sup> ± 0,50	2,44 <sup>a</sup> ± 0,10	2,07 <sup>a</sup> ± 0,48
Fibra alimentar total	25,12 <sup>a</sup> ± 0,95	15,25 <sup>c</sup> ± 0,65	19,78 <sup>b</sup> ± 0,43	12,00 <sup>d</sup> ± 0,27	15,35 <sup>c</sup> ± 2,38	10,40 <sup>d</sup> ± 0,27
Fibra alimentar solúvel	10,79 <sup>a</sup> ± 0,41	5,85 <sup>d</sup> ± 0,25	7,38 <sup>b</sup> ± 0,16	4,29 <sup>c</sup> ± 0,10	4,00 <sup>c</sup> ± 0,63	1,65 <sup>e</sup> ± 0,04
Fibra alimentar insolúvel	14,32 <sup>a</sup> ± 0,54	9,41 <sup>cd</sup> ± 0,40	12,40 <sup>ab</sup> ± 0,27	7,71 <sup>d</sup> ± 0,17	11,35 <sup>bc</sup> ± 1,76	8,75 <sup>d</sup> ± 0,23
<sup>1</sup> Carboidratos	28,73 ± 3,54	48,19 ± 2,83	38,93 ± 3,40	52,40 ± 6,20	40,29 ± 0,82	46,57 ± 1,44
<sup>2</sup> Valor calórico total (Kcal/100g)	361,42 ± 27,71	389,48 ± 7,09	379,90 ± 11,18	408,41 ± 21,39	391,51 ± 4,35	417,59 ± 18,61

Valores médios ± desvio padrão (n=3) seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).<sup>1</sup>

Teor de carboidratos calculados por diferença.<sup>2</sup> Valor calórico calculado segundo conversão: proteínas 4 Kcal/g, carboidratos 4 kcal/g, lipídeos 9 kcal/g.

Fonte: o autor, 2017.

Em relação ao teor de umidade, as bebidas adicionadas de polpa de macaúba, BLA5M, BL812M e BLA5+L812M apresentaram teores de 90,08%, 89,83% e 89,33% respectivamente. Para as bebidas sem adição de polpa de macaúba, os teores foram 87,33%, 87,41% e 87,88% para BLA5, BL812 e BLA5+L812 respectivamente.

Observou-se que as bebidas com polpa apresentaram maiores valores de umidade sendo significativamente diferentes das bebidas sem adição. Dentro do mesmo grupo (com e sem polpa), não ocorreu diferença significativa entre as bebidas. Os teores mais elevados de umidade observados para as bebidas com polpa de macaúba são decorrentes da adição da polpa.

Conforme descrito no item 4.2.7, a polpa foi preparada com a incorporação de água. Desta forma, ao adicioná-la nas bebidas, ocorreu o incremento dos teores de umidade. Em estudos precedentes, Kooper (2009) encontrou teores de umidade variando de 81,31% a 82,40% em bebidas fermentadas por cultura láctea de iogurte e *L. acidophilus* a base de EHS adicionadas de farinha de macaúba. Os menores valores em relação ao presente estudo podem estar relacionados a adição da farinha, que interfere no teor de sólidos na base seca, diminuindo o teor de umidade. Machado (2007) relata teores de 85,29 % para bebidas fermentadas a base de EHS, utilizando *L. acidophilus* e Carneiro (2015) encontrou teores de 87,70% e 86,74% para bebidas fermentadas pela mesma cultura. Marin (2012) obteve bebida fermentada a base de EHS, utilizando também *L. acidophilus* com 85% de umidade. Em comparação ao presente estudo, os resultados encontrados são semelhantes aos encontrados para as bebidas fermentadas sem adição de polpa de macaúba. Por fim, Trindade et al (2001) encontrou valores de 91,20% para iogurtes de EHS, valores um pouco superiores aos encontrados no presente estudo.

Pôde-se observar que os teores de proteínas das bebidas adicionadas da polpa de macaúba apresentaram valores mais elevados em comparação aquelas sem adição. Entretanto, essa diferença não foi significativa. Observa-se na Tabela 10 que os teores proteicos das bebidas BLA5M e BLA5 foram 29,39% e 23,21% respectivamente. Para as bebidas BL812M o teor foi de 25,21% e para BL812 foram 21,03%. E por fim, nas bebidas BLA5+L812M e BLA5+L812 os valores foram de 29,92% para a primeira e 27,47% para a última.

Apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, a adição da polpa de macaúba elevou os teores de proteína nas bebidas em que esta fora adicionada. Os teores encontrados para as bebidas fermentadas sem adição de polpa são semelhantes aos relatados por Martins et al (2009), que encontrou teor de 24,56% de proteínas em “iogurte de soja”. Nos estudos realizados por Bianchi (2013) e Fuchs et al. (2005), os valores proteicos encontrados para “iogurte de soja” foram 18,03% e 15,98% respectivamente, sendo menores que os encontrados no presente estudo. Em relação as bebidas adicionadas de polpa de macaúba, o resultado encontrado por Kooper (2009) variaram de 18,38% a 24,99% para as diferentes bebidas adicionadas de farinha de macaúba. Valores estes ligeiramente menores que os determinados no presente estudo.

Quando comparados aos teores proteicos de bebidas fermentadas a base de soja adicionadas de frutas, o estudo feito por Pereira et al. (2009) encontrou valores de 7,81% e 7,97% para adição de polpas de abacaxi e limão respectivamente. Estes valores foram muito inferiores aos alcançados pelas bebidas fermentadas adicionada de polpa de macaúba do presente estudo.

O teor proteico do EHS, usado em todos os estudos apresentados, é dependente da forma de extração. Sendo assim, diferentes metodologias de obtenção utilizadas resultam em EHS com diferentes teores proteicos e que, conseqüentemente, resultam em produtos fermentados com diferentes teores. Além disso, o uso de diferentes culturas lácteas resulta em produtos fermentados diferenciados uma vez que o metabolismo e as necessidades nutricionais destes microrganismos são diferentes.

Os teores de lipídeos das bebidas adicionadas de polpa de macaúba BLA5M (14,33%) e BL812M (13,71%) foram maiores que os encontrados para as bebidas sem adição BLA5 (11,54%) e BL812 (12,77%). Para as bebidas BLA5+L812 (13,49%), o teor foi maior que aquele encontrado para a bebida adicionada de polpa, BLA5+L812M (12,30%). Porém as diferenças observadas não foram significativas entre si.

Os teores de lipídeos encontrados para as bebidas sem adição de polpa do presente estudo são semelhantes aos descritos por Bianchi (2013) e Martins et al. (2013) cujos valores foram de 10,77% e 11,67% respectivamente. Já nos estudos de Fuchs et al. (2005), os teores encontrados foram inferiores (9,07%). No

desenvolvimento de bebida fermentada a base de EHS e soro de leite em pó, os teores lipídicos encontrados por Marin et al. (2014) foram de 14,61% para bebidas sem sabores. Neste estudo, o valor encontrado é próximo aos das bebidas adicionadas de polpa de macaúba, BLA5M e BL812M.

Na literatura, não foram encontradas bebidas fermentadas à base de EHS com adição de polpa de macaúba, sendo o estudo realizado por Kooper (2009), com utilização da farinha de macaúba, o mais próximo do presente estudo. Este apresentou teores lipídicos superiores (17,61% a 20,63%) aos relatados no presente estudo. Analisando bebidas fermentados à base de extratos vegetais, como a quinoa adicionada de polpa de morango, os teores lipídicos encontrados por Bicudo et al. (2012) foram de 13,19%, também semelhante aos teores das bebidas fermentadas a base de EHS. Quando utilizado extrato de castanha de baru adicionados de diversas frutas, os valores lipídicos das bebidas foram superiores, alcançando teores de 27,34% (FIOVARANTE, 2015).

Os teores de cinzas variaram de 1,70% (BL812) a 2,44% (BLA5+L812M). As bebidas adicionadas de polpa de macaúba apresentaram os maiores valores de cinzas em relação as não adicionadas. Entretanto, as diferenças observadas não foram significativas. BL812M apresentou teores de 2,38% e BLA5M, 2,34%. As bebidas BLA5 e BLA5+L812 apresentaram valores de 1,80% e 2,07% respectivamente. Estudos precedentes, reportam teores de cinzas variando de 0,86% a 3,24% para bebidas fermentadas a base de EHS por bactérias lácteas (FUCHS et al., 2005; PEREIRA et al. 2009; MARTINS et al., 2013; BIANCHI, 2013; MARIN et al., 2014).

O teor de fibra alimentar total foi o componente que mais apresentou diferenças significativas entre as amostras. As bebidas adicionadas de polpa de macaúba apresentaram teores mais elevados de fibra alimentar quando comparadas às mesmas versões sem adição. BLA5M foi a que apresentou maior teor de fibra alimentar (25,12%), seguida de BL812M (19,78%) e BLA5+L812M (15,35%). Dentro deste grupo, os teores foram diferentes entre si.

No grupo de bebidas onde não foram adicionados polpa de macaúba, o maior teor também foi para a bebida BLA5 (15,25%). Esse teor foi significativamente diferente das bebidas BL812 (12,00%) e BLA5+L812 (10,40%) e estas não apresentaram diferenças entre si.

Na comparação entre os grupos (com e sem polpa da macaúba), as bebidas BLA5 e BLA5+L812M foram as únicas que não apresentaram diferenças entre os teores de fibra alimentar.

No presente estudo, pôde-se observar que a adição de polpa de macaúba elevou valores de fibra alimentar nas bebidas adicionadas. Os valores encontrados para as bebidas BLA5M, BL812M e BLA5+L812M foram semelhantes aos encontrados nas bebidas avaliadas por Kooper (2009), que quando adicionadas de farinha de macaúba, apresentaram teores que variaram de 19,79% a 20,92%. Entretanto, as bebidas fermentadas sem adição da polpa também apresentaram teores de fibra significativo e superiores aos teores das bebidas avaliadas por Pereira et al. (2009), que obteve valores de 2,73% a 2,93%.

Os teores de fibra alimentar em bebida fermentada à base EHS são menores que os encontrados no grão de soja em decorrência do processo de obtenção do EHS. Os dados na literatura sobre o teor de fibra alimentar em bebidas fermentadas de soja ainda são escassos. Os valores obtidos nas bebidas fermentadas não adicionadas de polpa indicam que a base de fermentação (composta de EHS, sacarose e amido modificado) continha fibras alimentares ou oligossacarídeos de rafinose e estaquiose que não foram totalmente metabolizados pelas culturas fermentadoras ao longo do processo fermentativo. Além disso, é possível perceber que na bebida BLA5, onde o inóculo fermentador foi o *L. acidophilus*, o teor de fibra alimentar foi maior que nas demais. O mesmo comportamento é observado quando se analisa a bebida adicionada de polpa de macaúba, BLA5M fermentada pelo mesmo inóculo. Esteves (2011) demonstrou em seu estudo que os oligossacarídeos estaquiose e rafinose não foram totalmente consumidos durante a fermentação de EHS por cultura mista de *L. acidophilus*, *S. thermophilus*. Esses oligossacarídeos não são digeridos pelo trato gastrointestinal humano e agem como fibras insolúveis sendo fermentados pela microbiota intestinal. Nas bebidas, a fração insolúvel representa a maior parte da composição da fibra total presente, corroborando os resultados encontrados.

Em relação ao teor de carboidratos presentes nas bebidas, observou-se que as bebidas adicionadas de polpa de macaúba apresentaram menores teores deste componente. Como este foi calculado por diferença, uma vez que as bebidas adicionadas de polpa de macaúba obtiveram maiores teores em relação a

proteínas, lipídeos, cinzas e fibras; os teores de carboidratos são reduzidos em comparação as bebidas sem adição.

A composição físico química das bebidas demonstra que as bebidas fermentadas à base de EHS com e sem adição de polpa de macaúba podem fornecer proteínas, lipídeos, fibras e minerais. Os diferentes inóculos utilizados resultaram em bebidas com teores iguais de proteínas, lipídeos e cinzas. Já nas bebidas onde o *L. acidophilus* foi o agente fermentador, os teores de fibra alimentar foram mais elevados (BLA5 e BLA5M) em comparação as demais.

Os resultados demonstram o potencial nutricional das formulações avaliadas e ainda permite destaque na informação nutricional complementar como fonte de fibras, uma vez que todas as formulações, com e sem adição de polpa de macaúba, atendem o requisito mínimo de 2,5 g fibras na porção (200 g). Além disso, as bebidas adicionadas de polpa de macaúba poderão fornecer teores de carotenoides complementares aos necessários a ingestão humana, uma vez que a fruta contém teores significativo deste composto.

### 6.9. Análise microbiológica das bebidas fermentadas

Os resultados das análises microbiológicas das bebidas fermentadas estão demonstrados na Tabela 12.

**Tabela 12 – Análise microbiológica das bebidas fermentadas**

Bebidas	*Pesquisa		
	Enumeração de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g)	Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> (25g)	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (Log UFC/mL)
BLA5	< 3,0	Ausência	< 1
BL812	< 3,0	Ausência	< 1
BLA5+L812	< 3,0	Ausência	< 1
BLA5M	< 3,0	Ausência	< 1
BL812M	< 3,0	Ausência	< 1
BLA5+L812M	< 3,0	Ausência	< 1

Fonte: o autor, 2017. \* Amostras indicativas.

As amostras de bebidas fermentadas avaliadas atenderam aos padrões microbiológicos definidos pela legislação vigente para produtos à base de soja em todas as pesquisas realizadas. Os resultados demonstraram que o processamento das bebidas foi realizado dentro dos padrões higiênicos-sanitários desejáveis.

## 6.10. Análise de pH, acidez e viabilidade celular das formulações de bebida fermentada a base de EHS durante armazenamento refrigerado

### 6.10.1. Bebida fermentada sem adição de polpa de macaúba

#### 6.10.1.1. pH e acidez

Os resultados do pH e acidez (% de ácido láctico) estão demonstrados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente, para todas as bebidas durante 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Tabela 13-** Valores de pH das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

	Dias				
	0	7	14	21	28
BLA5	4,52 <sup>aX</sup>	4,50 <sup>aX</sup>	4,50 <sup>aX</sup>	4,47 <sup>aX</sup>	4,47 <sup>aX</sup>
BL812	4,71 <sup>aY</sup>	4,57 <sup>bX</sup>	4,55 <sup>bX</sup>	4,53 <sup>bX</sup>	4,52 <sup>bX</sup>
BLA5+L812	4,58 <sup>aX</sup>	4,57 <sup>aX</sup>	4,61 <sup>aX</sup>	4,57 <sup>aX</sup>	4,61 <sup>aX</sup>

(<sup>a, b, ...</sup>) Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). (<sup>X, Y, ...</sup>) Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). Fonte: o autor, 2017.

Avaliando o comportamento do pH, dentro do mesmo dia (letras maiúsculas) para todas as bebidas analisadas, observou-se que não houve diferença significativa entre as bebidas BLA5 e BLA5+L812 durante todo o período de armazenamento avaliado. A bebida BL812 diferiu significativamente das demais no dia 0, apresentando maior valor de pH (4,71) nesse dia. A partir do 7º dia o valor de pH foi igual as demais bebidas e permaneceram constante ao longo do armazenamento.

Analisando individualmente cada bebida (letras minúsculas), observou-se que a bebida BL812 foi a única que apresentou diferença significativa entre o dia 0 e os demais (7, 14, 21 e 28). O pH variou de 4,71 no dia 0 para 4,52 no dia 28. Entre os dias 7, 14, 21 e 28, é possível observar o declínio do pH, com valores 4,57, 4,55, 4,53 e 4,52 respectivamente. Entretanto esse declínio não foi significativo. Na bebida BLA5, o declínio do pH de 4,52 até 4,47 (dia 0 ao dia 28) não foi significativo. Já a bebida BLA5+L812 apesar da variação do comportamento do pH, não foram encontradas diferenças significativas entre os dias de armazenamento. O pH apresentou redução entre os dias 0 (4,58%) e 7 (4,57%), seguido de aumento entre os dias 7 (4,57%) e 14 (4,61 %). O mesmo comportamento foi encontrado para os dias 14 e 21 com decréscimo (4,61% e 4,57%) e 21 e 28 com aumento (4,51% a 4,61%).

Em processos fermentativos, o pH é utilizado como ferramenta de monitoramento da evolução da fermentação e também durante o armazenamento do produto final (OLIVEIRA et al., 2001). O pH é responsável pelo aspecto visual do produto durante o armazenamento, sendo que a manutenção dos valores, proporciona a estabilidade do produto. Na produção de bebidas fermentadas a base de EHS, o pH final deverá ser abaixo de 4,6 uma vez que as proteínas se tornam insolúveis e atingem maior estabilidade do gel formado nesta faixa de pH. Todas as bebidas fermentadas avaliadas apresentaram-se pH menor que 4,6. Entretanto, no estudo realizado por Riquette (2013), os valores finais para as bebidas fermentadas por *L. acidophilus* puro foram de 4,19. Nesse estudo, o pH final das bebidas fermentadas por *L. acidophilus* foi menor, apresentando queda significativa entre os dias iniciais e finais. Behrens (2002) e Kooper (2009) relata valores de pH de 4,40 e 4,18 respectivamente no desenvolvimento de bebida fermentada a base de EHS utilizando *L. acidophilus*. Porém, em seu estudo não houve acompanhamento do pH ao longo do armazenamento, sendo estes valores referentes apenas no final do processo fermentativo. As diferenças nos processos em relação ao preparo inicial do inóculo, o modo de preparo das bebidas, o tempo de fermentação e a formulação base da fermentação podem justificar as diferenças encontradas, uma vez que as condições de preparo foram diferentes.

Na associação do *L. acidophilus* com a cultura tradicional de iogurte, o pH das bebidas (BLA5+L812) apresentou valores ligeiramente mais elevados em

comparação com as demais e com os estudos apresentados, indicando que a associação do *L. acidophilus* + *S. thermophilus* + *L. bulgaricus* pode não ser tão positiva. Wang et al. (1994), demonstrou que quando a associação do *L. acidophilus* ocorre com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* isoladamente, os valores de pH final são menores, atingindo a faixa de 3,98-4,05 sugerindo que a metabolização do EHS é mais eficiente neste tipo de associação. Riquette (2013) também relata valores de pH menores (4,16 a 3,70) quando utiliza inóculos mistos de *L. acidophilus* e *L. casei*. em comparação ao uso isolado do *L. acidophilus*.

Quando analisamos os valores de pH para as bebidas fermentadas por cultura tradicional de iogurte, o pH encontrado no presente estudo é semelhante aos relatados por Umbelino (2001), que no desenvolvimento de “iogurte de soja” enriquecido com cálcio, o pH final da fermentação foi de 4,47 e inferior aos produtos desenvolvido por Miguel et al. (2010), que ao utilizar extrato desengordurado de soja e espessante obteve produtos com pH =4,68. Fuchs et al., (2005) obteve valores na faixa de 4,37- 4,72 ao fermentar EHS suplementado com FOS e inulina utilizando culturas lácteas de iogurte. As bebidas fermentadas resultantes da fermentação por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* do presente estudo apresentaram pH próximos e tempo de fermentação semelhante aos obtidos no processamento de iogurte. A definição do pH ideal é dependente das características desejadas para o produto e sua avaliação sensorial.

**Tabela 14** - Valores de acidez (% ácido láctico) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

	Dias				
	0	7	14	21	28
BLA5	0,30 <sup>aX</sup>	0,30 <sup>aX</sup>	0,32 <sup>bX</sup>	0,32 <sup>bX</sup>	0,33 <sup>bX</sup>
BL812	0,34 <sup>aX</sup>	0,33 <sup>aX</sup>	0,33 <sup>aX</sup>	0,33 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>
BLA5+L812	0,34 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>	0,33 <sup>aX</sup>

(<sup>a, b, ,</sup>) Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). (<sup>X, Y</sup>) Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). Fonte: o autor, 2017.

A avaliação da acidez em cada uma das bebidas, demonstrou que apenas BLA5 apresentou diferenças significativas entre os dias de armazenamento. No período de 0 a 7 dias, a acidez se manteve constante. A partir do 14º dia, observou-

se um aumento da acidez em relação ao período anterior que, a partir daí se manteve constante até o período final da avaliação (dia 28). As bebidas BL812 e BLA5+L812 não apresentaram diferenças significativa entre os dias, sendo observado pequena alteração no valor de acidez para BL812 e acidez constante ao longo dos 28 dias para BLA5+L812. Quando avaliamos os valores de acidez entre as bebidas dentro do mesmo dia, não foram observadas diferenças significativas entre elas ao longo dos 28 dias de armazenamento.

Nas bebidas avaliadas, observou se que a acidez dos produtos aumentou em decorrência da redução do pH indicando a produção de ácido láctico pelos inóculos. Os teores de acidez para as bebidas avaliadas foram semelhantes, indicando que ambos os inóculos utilizados, LA-5 e YF-L812, são capazes de fermentarem o EHS, porém em velocidades diferentes.

Nas bebidas BLA5 e BLA5+L812, os valores de acidez determinados durante o armazenamento foram superiores aos relatados por Bernal-Mondrágón (2004), que alcançou valores de 0,11% no mesmo tempo de fermentação do presente estudo ao utilizar inóculo de *L. acidophilus* puro. Porém não foram realizadas análises ao longo do armazenamento refrigerado. Em comparação ao estudo realizado por Riquette (2013) os valores de acidez foram semelhantes. A acidez determinada na fermentação do EHS por *L. acidophilus* nesse estudo foi de 0,37%. O mesmo comportamento foi observado quando utilizou-se a mistura de *L. acidophilus* + *L. casei*.

Quando foi avaliado as bebidas fermentadas pela cultura do iogurte, observa-se que os valores de acidez ao longo do período avaliado são semelhantes aos relatados por Fuchs et al (2005) e inferiores aos relatados por Esteves (2011) que alcançaram valores de 0,36% e 0,83%.

#### **6.10.1.2. Viabilidade celular das culturas lácteas utilizadas**

A Tabela 15 apresenta os resultados da contagem de células viáveis (log UFC/mL) nas bebidas durante 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Tabela 15-** Valores da viabilidade celular (log UFC/mL) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

	Dias				
	0	7	14	21	28
BLA5	7,18 <sup>aX</sup>	6,11 <sup>bX</sup>	5,53 <sup>bX</sup>	4,43 <sup>cX</sup>	4,18 <sup>cX</sup>
BL812	6,94 <sup>aX</sup>	6,98 <sup>aY</sup>	7,29 <sup>aY</sup>	7,24 <sup>aY</sup>	6,27 <sup>bY</sup>
*BLA5+L812	6,78 <sup>aX</sup>	5,69 <sup>bX</sup>	5,45 <sup>bX</sup>	5,01 <sup>bX</sup>	3,58 <sup>cX</sup>

(<sup>a, b, c</sup>) Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). (<sup>X, Y</sup>) Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). Fonte: o autor, 2017. \* Contagem de células viáveis de *L.acidophilus*

A viabilidade celular do inóculo YF-L812 utilizado na bebida BL812 permaneceu constante, com valores próximos a 7 log UFC/mL até o 21º dia de armazenamento refrigerado. No dia 28, ocorreu redução significativa de um ciclo log no número de células viáveis, alcançando valores de 6,27 log UFC/mL. Apesar da redução no último dia avaliado, a contagem de células viáveis atende o requisito definido para leite fermentado da IN 46 de 23/10/2007. A bebida BL812 não pode ser denominada como leite fermentado, mas como não existe definições oficiais para este tipo de produto, adotou-se este parâmetro.

A viabilidade celular do *L.acidophilus*, quando usado sozinho (BLA5) ou em associação com a cultura de iogurte (BLA5+L812) sofreu declínio ao longo do armazenamento. Para a bebida BLA5, observou-se que no dia 0, a contagem de células viáveis foram 7,18 log UFC/mL. No dia 7, a contagem sofreu redução de um ciclo log, alcançando valores de 6,11 log UFC/mL. No dia 14, apesar da contagem ser um ciclo log inferior ao dia 7, estatisticamente “não houve diferença”. No 21º dia, a viabilidade reduziu em mais um ciclo log, alcançando valores de 4,43 log UFC/mL e a partir daí se manteve constante até o final do período armazenado (28 dias). Os resultados demonstram declínio de três ciclos log na viabilidade celular da cepa de *L. acidophilus* quando este foi usado para fermentar o produto. Na bebida BLA5+L812, foram observados o declínio de três ciclos log na viabilidade de *L acidophilus*. Entretanto, o comportamento deste declínio foi diferente da bebida BLA5. Quando utilizado juntamente com inóculo de YF-L812, a velocidade de redução decimal do *L. acidophilus* foi menor. No início da avaliação (dia 0), a contagem inicial foi menor em comparação a BLA5, apresentando valores de 6,78

log UFC/mL. No dia 7, ocorreu a primeira redução decimal na viabilidade (5,69 log UFC/mL) e esta permaneceu constante nos dias 14 (5,45 log UFC/mL) e 21 (5,01 log UFC/mL). No último dia avaliado (28°), a viabilidade apresentou duas reduções decimais atingindo valores de 3,58 log UFC/mL.

O comportamento da viabilidade celular dentro do mesmo dia, para as três bebidas avaliadas, foi diferente nos dias 7, 14, 21 e 28 para a bebida BL812. O resultado era esperado uma vez que o inóculo de YF-L812 apresentou maior viabilidade ao longo do armazenamento quando comparado ao inóculo de La-5.

Os resultados demonstram que a cultura tradicional do iogurte apresentou alta viabilidade celular ao longo do período de armazenamento avaliado. O mesmo foi relatado por Esteves (2011), Kooper (2009) e Umbelino (2001), que verificaram a manutenção da viabilidade celular nos produtos desenvolvidos utilizando culturas tradicionais de iogurte.

Nas bebidas fermentadas por *L. acidophilus* ou da associação deste com cultura tradicional de iogurte, os resultados demonstraram que a cultura perdeu viabilidade ao longo do armazenamento. Este resultado diverge dos estudos descritos por Barbosa (2007), Bernal-Mondragon (2009), Kooper, (2009) que descrevem valores acima de 9 log UFC/mL após 28 dias de armazenamento para bebidas fermentadas por inóculos puros de *L. acidophilus*. Riquette (2013) relata dados semelhantes ao presente estudo em relação ao comportamento do *L. acidophilus* ao longo do armazenamento. Ao analisar a contagem de células viáveis nas bebidas avaliadas, os valores finais foram de 5 log UFC/mL. Quando ocorreu a associação do *L. acidophilus* com outra cultura probiótica (*L. casei*) a viabilidade manteve-se elevada e constante, indicando que a associação entre essas duas espécies foi positiva.

Desta forma, o resultado indica que as bebidas desenvolvidas com uso do *L. acidophilus* apresentou potencial probiótico apenas até o 7° dia para a BLA5 e apenas no 1° dia para a BLA5+L812, em relação a consideração da viabilidade mínima de 8 log UFC/mL na porção (180 g) (FALEIRO,2015).

#### **6.10.2. Bebida fermentada com adição de polpa de macaúba**

### 6.10.2.1. pH e acidez

As Tabela 16 e 17 apresenta, respectivamente os resultados do pH e acidez (% de ácido láctico) das bebidas durante 28 dias de armazenamento a temperatura de  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Tabela 16-** Valores de pH das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

	Dias				
	0	7	14	21	28
BLA5M	4,63 <sup>aX</sup>	4,57 <sup>bX</sup>	4,51 <sup>cX</sup>	4,49 <sup>cX</sup>	4,52 <sup>bcX</sup>
BL812M	4,71 <sup>aX</sup>	4,57 <sup>bX</sup>	4,55 <sup>bX</sup>	4,53 <sup>bX</sup>	4,52 <sup>bX</sup>
BLA+L812M	4,58 <sup>aX</sup>	4,57 <sup>aX</sup>	4,61 <sup>aX</sup>	4,57 <sup>aX</sup>	4,61 <sup>aX</sup>

(a, b, c) Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). (X, Y) Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). Fonte: o autor, 2017. \* Contagem de células viáveis de *L.acidophilus*

Nas bebidas adicionadas de polpa de macaúba, os valores de pH, quando avaliados dentro do mesmo não apresentaram diferença significativa entre as bebidas durante todo o período de armazenamento.

Quando avaliado individualmente para cada uma das bebidas, o pH da bebida BLA5+L812M foi o único que não apresentou diferença significativa entre os dias de armazenamento apresentando valores constantes ao longo dos 28 dias avaliados (4,57-4,61).

Na bebida BL812M, observou-se um declínio do pH a partir do 7º dia de armazenamento. Inicialmente, o pH foi de 4,71 no dia 0 passando para 4,57 no dia 7 e permanecendo na faixa de 4,57-4,52 nos dias 14, 21 e 28. O pH no dia 0 foi significativamente maior que os valores observados nos dias subsequentes. Essa diferença indica que o processo fermentativo no dia 0 estava incompleto e que foi finalizado durante o armazenamento. Como as análises foram realizadas semanalmente, não foi possível afirmar precisamente em qual dia (entre 0 e 7) a fermentação foi estabilizada, sendo observada redução e estabilização do pH apenas a partir do 7º dia.

A bebida BLA5M apresentou valores de pH significativamente diferentes ao longo dos 28 dias de armazenamento. No dia 0, o pH se encontrava em 4,63. No dia 7, observou-se redução significativa no pH, que alcançou valores de 4,57. A redução ainda foi observada no dia 14 (pH= 4,51) e este se manteve constante até o final da avaliação com valores de 4,49 e 4,52 para os dias 21 e 28 respectivamente. Ainda foi possível observar que o pH final, no dia 28, sofreu elevação sendo igual ao pH determinado no dia 7.

**Tabela 17-** Valores de acidez (% ácido láctico) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

	Dias				
	0	7	14	21	28
BLA5M	0,28 <sup>aX</sup>	0,30 <sup>bX</sup>	0,32 <sup>bcX</sup>	0,33 <sup>cdX</sup>	0,34 <sup>dX</sup>
BL812M	0,27 <sup>aX</sup>	0,31 <sup>bX</sup>	0,31 <sup>bX</sup>	0,32 <sup>bcX</sup>	0,33 <sup>cX</sup>
BLA+L812M	0,34 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>	0,34 <sup>aX</sup>

(<sup>a, b, c</sup>) Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). (<sup>X, Y</sup>) Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). Fonte: o autor, 2017. \* Contagem de células viáveis de *L.acidophilus*

Assim como na avaliação do pH, a acidez não apresentou diferença significativa entre as bebidas dentro do mesmo dia, durante todo o período de armazenamento.

Quando foi avaliado o comportamento da acidez individualmente para cada uma das bebidas, observamos que a bebida BLA5+L812M manteve os teores de acidez constantes ao longo dos 28 dias, sem diferenças significativas entre si (0,34 %).

A bebida BL812M apresentou aumento de acidez expressos em % ácido láctico entre os dias 0 e 28. No primeiro dia, a acidez era de 0,27% e observou-se aumento dos teores no dia 7 (0,31%) e no dia 28 (0,33%). A acidez foi idêntica e constante entre os dias 7 (0,31%), 14 (0,31%) e 21 (0,32%). O mesmo comportamento foi observado entre os dias 21 (0,32%) e 28 (0,33 %).

Na bebida BLA5M, a acidez também aumentou ao longo do armazenamento refrigerado. O dia 0 foi o que apresentou menor teor de acidez (0,28%). O dia 7 e 14 apresentaram teores significativamente iguais sendo 0,30% e 0,32%

respectivamente para cada um. O teor de acidez do dia 14 (0,32%) foi igual ao dia 21 (0,33%) e este, ao dia 28 (0,34%). Houve diferenças entre os valores de acidez observadas entre os dias 7 e 21 e entre os dias 14 e 28.

O comportamento dos parâmetros de pH e acidez foram semelhantes aos relatados no item 6.10.1.1. A adição da polpa de macaúba não exerceu influência no comportamento destes atributos de maneira significativa, apesar de terem sido observadas pequenas variações nos valores. Essas pequenas diferenças podem ser associadas a reações bioquímicas ocorridas nas bebidas ao longo do armazenamento decorrente da interação com a polpa de fruta que foi utilizada de forma ‘in natura’ apenas com inibição do escurecimento enzimático observado. Entretanto, o estudo desta interação entre os componentes não foi abordado no presente trabalho.

#### 6.10.2.2. Viabilidade celular das culturas utilizadas

A Tabela 18 apresenta os resultados da contagem de células viáveis (log UFC/mL) nas bebidas durante 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Tabela 18-** Valores da viabilidade celular (log UFC/mL) das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

	Dias				
	0	7	14	21	28
BLA5M	6,10 <sup>aX</sup>	5,20 <sup>bX</sup>	4,50 <sup>cX</sup>	4,56 <sup>cX</sup>	4,12 <sup>cX</sup>
BL812M	7,59 <sup>aY</sup>	7,62 <sup>aY</sup>	7,18 <sup>aY</sup>	7,77 <sup>aY</sup>	7,77 <sup>aY</sup>
*BLA+L812M	6,13 <sup>aX</sup>	5,42 <sup>bX</sup>	4,56 <sup>cX</sup>	3,65 <sup>dX</sup>	3,16 <sup>dX</sup>

(<sup>a, b, c</sup>) Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). (<sup>X, Y</sup>) Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha < 0,5$ ). Fonte: o autor, 2017. \* Contagem de células viáveis de *L.acidophilus*

A viabilidade do *L. acidophilus* nas bebidas BLA5M e BLA5+L812M apresentaram declínio ao longo do armazenamento refrigerado, com diferenças significativas entre os dias. No dia 0, as duas bebidas apresentaram contagens de 6,10 log UFC/mL e 6,13 log UFC/mL para BLA5M e BLA5+L812M respectivamente.

No 7° dia, ocorreu redução de um ciclo log em ambas e no 14° dia, as duas bebidas já apresentavam contagens de 4,50(BLA5M) e 4,56 (BLA5+L812M) log UFC/mL. A partir deste dia, podemos observar que o o comportamento da viabilidade apresentou diferença entre as bebidas. Na BLA5M, o *L. acidophilus* se manteve constante até o 28 dia, apresentando contagem final de 4,12 log UFC/mL.

Já na bebida BLA5+L812M, ocorreu mais uma redução de um ciclo log no dia 21 e a concentração celular se manteve constante até o 28° dia da estocagem. Os resultados nos permitem inferir que a resistência do *L. acidophilus* foi maior quando este era o agente fermentador utilizado (BLA5M) apesar de ambas as bebidas apresentarem declínio na viabilidade celular. A legislação brasileira para alimentos com alegação de propriedade funcionais em termos de probióticos, não define número mínimo viável para o probiótico utilizado. Entretanto, diversos estudos apontam como ideal a manutenção de no mínimo 6 log UFC/mL (VINDEROLA e REINHEIMER, 2000) ou 8 log UFC/na porção de células viáveis (FALEIRO, 2015). Por este ponto de vista, as bebidas contendo *L. acidophilus* apenas apresentariam propriedades funcionais apenas no 1° dia de estocagem, que foi o limite para manutenção da viabilidade mínima de 8 log UFC, considerando a porção de 200mL.

Para as bebidas fermentadas com cultura tradicional de iogurte, observou-se que as células se mantiveram viáveis durante todo o período de estocagem avaliado, sem sofrer redução na contagem inicial. A BL812M apresentou contagens superiores a 7 log UFC/mL e apesar de não poder ser classificada como “iogurte” ou “leite fermentado”, atende aos mesmos requisitos definidos para estes produtos de acordo com a IN 46 de 23/11/2007.

O comportamento da viabilidade celular entre as diferentes bebidas dentro do mesmo dia, observou-se que a bebida BL812M apresentou contagem superior as bebidas BLA5M e BLA5+L812M sendo significativamente diferente. Esse resultado era esperado, pois a manutenção celular da cultura YF-L812 foi superior à do inóculo de LA-5 ao longo do armazenamento nas bebidas fermentadas.

Sendo assim, a adição de polpa de macaúba não influenciou a viabilidade nas bebidas fermentadas pela cultura tradicional de iogurte. Esse aspecto não foi observado nas BLA5M e BLA5+L812M, onde foram observados redução da viabilidade celular.

### **6.11. Considerações finais sobre vida de prateleira e monitoramento dos atributos avaliados nas bebidas fermentadas a base de EHS.**

A avaliação da vida de prateleira permite conhecer e avaliar as características intrínsecas e extrínsecas do produto assim como as condições de boas práticas adotadas durante seu processamento. Esses fatores influenciam a vida útil dos produtos, provocando alterações sensoriais, físicas e microbiológicas. O leite fermentado de soja é um produto que quando pH se encontra muito baixo e a acidez elevada, pode ocorrer desestabilidade da estrutura protéica e coagulação, visto que as proteínas do leite de soja apresentam ponto isoelétrico em pH próximos a 5,8 (BERNAL-MONDRAGÓN, 2004). Produtos com alta acidez podem apresentar alterações sensoriais no sabor, desenvolvendo gosto amargo. Além disso, por ser um produto com alta atividade de água e alto teor proteína, a perecibilidade é maior, necessitando de armazenamento refrigerado pós processamento para manutenção da estabilidade microbiológica e bioquímica (SVASILJEVIC & SHAH, 2008; KOMATSU et al., 2008). Na maioria dos trabalhos envolvendo a determinação da vida de prateleira em produtos fermentados a base de soja e também de base láctea, o tempo avaliado é de 28 dias, que corresponde ao período mínimo economicamente viável para comercialização desse tipo de produto. O monitoramento do pH, acidez total, sinérese e viabilidade celular das culturas fermentadoras são as principais análises realizadas, sendo obrigatória a manutenção de padrão mínimo de viabilidade celular em produtos probióticos e em alguns produtos fermentados. O acompanhamento microbiológico para controle higiênico sanitário ao longo da vida de prateleira não é prática comum, uma vez que o baixo pH e os teores de acidez desenvolvidos são suficientes para manter a estabilidade dos produtos frente aos contaminantes que possam estar presentes (BERNAL- MONDRAGÓN, 2004; HAULY et al., 2005; EVANGELISTA, 2011).

Em produtos fermentados, o pH poderá apresentar variações durante o armazenamento devido a atividade metabólica das culturas utilizadas no processo. No presente estudo, as bactérias lácteas usadas, apresentaram baixa atividade pós processamento.

A acidez dos produtos fermentados torna-os relativamente mais estáveis por inibir o crescimento de bactérias contaminantes, principalmente as Gram negativas. Na fermentação láctica, o ácido láctico é o principal produto formado, sendo responsável pelo declínio do pH e aumento da acidez nos produtos. Em produtos fermentados a base de EHS, a acidez é responsável por melhorar a característica sensorial do produto, mascarando os sabores desagradáveis advindos dessa fonte vegetal (HOU et al., 2000; MORAES et al., 2006).

A tabela 19 apresenta o resumo comparativo das bebidas adicionadas e não adicionadas de polpa de macaúba em relação aos atributos avaliados.

**Tabela 19-** Comparativo entre as bebidas em relação aos atributos avaliados

Bebida	pH		Acidez (% ácido láctico)		Viabilidade (log UFC/mL)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
BLA5	4,52	4,47	0,30	0,33	7,18	4,18
BLA5M	4,63	4,52	0,28	0,34	6,10	4,12
BL812	4,71	4,52	0,33	0,34	6,94	6,27
BL812M	4,71	4,52	0,27	0,33	7,59	7,77
BLA5+L812	4,58	4,61	0,34	0,34	*6,78	*3,58
BLA5+L812M	4,58	4,61	0,34	0,34	*6,13	*3,16

Valores médios. \* Contagem referente a *L. acidophilus*. Fonte: o autor, 2017

#### 6.11.1. Bebidas fermentadas por *L. acidophilus*

Em termos gerais, ao se comparar os valores iniciais e finais de pH e acidez das bebidas BLA5 e BLA5M, podemos observar que nas bebidas adicionadas de polpa de macaúba (BLA5M), os valores de pH foram maiores no início (4,63) e no final (4,52) do armazenamento em comparação aos valores das bebidas não adicionadas de polpa (BLA5) que apresentaram valores de 4,52 e 4,47 para o pH inicial e final, respectivamente. Em relação a acidez, o teor inicial foi menor (0,28 %) na bebida adicionada de macaúba (BLA5M) e os valores finais foram semelhantes (0,33% para BLA5 e 0,34% para BLA5M) em ambas. Os valores de pH e acidez normalmente podem ser inversamente correlacionados. Entretanto, no

presente estudo, observou-se que na bebida fermentada a base de EHS adicionada de polpa de macaúba (BLA5M), o valor de pH foi maior quando a acidez também aumentou. Esse comportamento pode ser decorrente de interação dos compostos da polpa com os ácidos produzidos, neutralizando ou aumentando o poder tamponante do meio. Entretanto, esta investigação não foi abordada no desenvolvimento deste estudo. Em relação a viabilidade, apenas no início do armazenamento as contagens foram menores nas bebidas adicionadas de polpa de macaúba (BLA5M). No final, ambas as bebidas apresentaram queda na contagem de células viáveis na mesma proporção. Os parâmetros avaliados demonstram que o comportamento característico de pós acidificação não ocorreu nas bebidas fermentadas exclusivamente por *L. acidophilus* durante o armazenamento podendo ser associado a morte celular. Nos estudos relatados por Oliveira et al., (2002), Kooper (2009), Evangelista (2011) e Barbosa (2007) foram observados redução no número de células viáveis ao longo do armazenamento refrigerado. Entretanto, em todos estes, as contagens de células viáveis permaneceram acima de 6 log UFC/mL. Apenas no estudo de Riquette (2013), as contagens apresentaram-se abaixo de 5 log UFC/mL.

#### **6.11.2. Bebidas fermentadas por YF-L812**

Nas bebidas fermentadas pelo inóculo de YF-L812, os valores de pH foram idênticos nas duas bebidas (BL812 e BL812M) não sofrendo mudanças decorrente da adição da polpa de macaúba. Em relação a acidez, observou-se um valor menor para a bebida adicionada de polpa de macaúba (0,27%) no início do armazenamento. No final, os teores foram semelhantes, sendo 0,33% para BL812 e 0,34% para BL812M. Na análise de viabilidade, observou-se que nas bebidas adicionadas de polpa de macaúba (BL812M), a contagem foi 1 ciclo log maior no início e no final do período de armazenamento quando comparada a bebida sem adição (BL812). Porém ambas as bebidas apresentaram contagens superiores a 6 log UFC/mL demonstrando a resitência e adaptação dessa cultura em base não láctea. A pós acidificação não foi observada durante o armazenamento refrigerado e isso pode esta associado a característica desta cultura comercial que é classificada como muito baixa pós acidificação.

### **6.11.3. Bebidas fermentadas por YF-L812 + *L. acidophilus***

Nesta formulação, o agente fermentador principal foi o inóculo de YF-L812, que atuou como cultura iniciadora do processo fermentativo. Ao analisar os parâmetros de pH e acidez, observou-se que estes foram constantes nas duas bebidas (BLA5+L812 e BLA5+L812M) no início e no final do período de armazenamento. Nesta formulação, a adição de polpa de macaúba não exerceu influência sobre nenhum dos parâmetros avaliados. Quando se analisa a viabilidade celular, equivalente a contagem apenas de *L. acidophilus*, o comportamento de ambas as bebidas foi semelhante, apresentando valores iniciais e finais praticamente idênticos. O uso de *L. acidophilus* em associação com cultura de iogurte apresentou os mesmos resultados em relação ao comportamento e viabilidade celular durante o armazenamento refrigerado descrito no item 6.11.1, mostrando-se não ideal para desenvolvimento de produtos probióticos nestas condições de processo.

## 7. CONCLUSÃO

A polpa de macaúba, tem grande potencial nutricional visto que apresenta, apresenta teores significativos de fibra alimentar, lipídeos e proteínas. Sendo assim, pode auxiliar no enriquecimento nutricional das preparações alimentares, fornecendo além dos nutrientes essenciais, carotenoides com potencial pró vitamínico A, enriquecendo ainda mais as preparações alimentares ou aplicações industriais.

Em relação as culturas lácteas, conclui-se que cultura tradicional do iogurte, composta por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, e a cultura probiótica de *L. acidophilus* são capazes de crescerem em extrato hidrossolúvel de soja desenvolvendo acidez e alcançando valores de pH desejáveis no desenvolvimento de produtos fermentados a base de EHS, apesar do tempo de fermentação ser mais elevado quando se utiliza *L. acidophilus*.

As bebidas fermentadas a base de EHS desenvolvidas com polpa de macaúba teve influência positiva nos teores de fibra alimentar de todas as bebidas adicionadas. Desta maneira, as bebidas desenvolvidas fornecem fibras alimentares e podem ser caracterizadas como fontes de fibras por atenderem aos requisitos legais definidos na legislação vigente

Em relação aos parâmetros avaliados durante o armazenamento refrigerado à  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  das bebidas, a viabilidade celular de *L. acidophilus* apresentou redução ao longo do armazenamento enquanto a viabilidade da cultura tradicional de iogurte permaneceu viáveis durante 28 dias. Desta forma, a utilização da cultura do iogurte mostrou-se satisfatória e tecnologicamente viável.

A alegação de propriedade funcional e de saúde das bebidas contendo probióticos em relação aos padrões definidos na porção, só foi comprovada até o 7º dia para BLA+L812, e apenas no 1º dia para BLA5, BLA5M e BLA5+L812M. Sendo assim, nenhuma das bebidas demonstra potencial para aplicação deste probiótico no desenvolvimento deste produto nas condições avaliadas.

Os parâmetros de pH e acidez necessitam serem avaliados sensorialmente de modo a definir os teores ideais a serem mantidos no desenvolvimento das formulações assim como na aceitação da adição da polpa de macaúba.

Faz-se necessário maiores estudos e desenvolvimento de novas formas de aplicação do *L. acidophilus* de forma a garantir sua viabilidade e conseqüentemente o efeito probiótico desejado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. H. L. Desenvolvimento, acúmulo de óleo e armazenamento de frutos da macaúba. Janaúba. Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes. 2014. 83 f. (Dissertação, mestrado em Produção Vegetal no Semiárido).

ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 11, 2155–2159. 2011.

ALMEIDA, S.P. Cerrado: aproveitamento alimentar. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 188 p.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, São Paulo, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANTUNES, A. E. C. Influência do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de iogurtes naturais desnatados. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UEC). 2004. 219 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição na Faculdade de Engenharia de Alimentos).

AOAC. (2012). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis (19th ed.). Washington D.C: AOAC.

ARAGÃO, T.F. Macaúba (*Acrocomia aculeata*): caracterização centesimal, potencial antioxidante e compostos fenólicos da polpa e amêndoa. Campo Mourão. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso.

ARAÚJO, J. M. A. et al. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de  $\beta$ -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 17, p. 137-141, 1997.

ARAÚJO, R. A. C.; ARAÚJO, W. M.C. Fibras alimentares. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v.13, p.201- 209, 1998

ARGANDOÑA-SANJINEZ, E. J.; CHUBA, C. A. M. Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva (*Acrocomia aculeata* Jacq. Lodd.). *Rev. Bras. Frutic.* v.33, n.3, Jaboticabal, set., 2011.

BARBOSA, E. G. Prevalência de bactéria probiótica *L. acidophilus* – NCFM em extrato de soja fermentado e saborizado com sacarose e polpa de pêssego. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 2007. 58 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

BARBOSA, K.B.F et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BASHO, S. M.; BIN, M. C. Propriedades dos Alimentos Funcionais e seu Papel na Prevenção e Controle da Hipertensão e Diabetes. *Interbio* v.4 n.1 - ISSN 1981-3775, 2010.

BEHRENS, J.H. et al. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. *Bol. SBCTA*, v. 34, p. 99-106, 2000.

BEHRENS, J. H. Aceitação, atitude e expectativa do consumidor em relação a uma nova bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja (*Glycine Max L- Merrill*). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. 2002. 173 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).

BERNAL- MONDRAGON, O L. Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 2004. 132 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Alimentos).

BERNAL-MONDRAGON, O. L. Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 2009, 218 p. (Tese, Doutorado em Engenharia de Alimentos).

BHATHENA, S. J. et al. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002, 76, 1191-1201. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450882>>. Acesso em 02 de outubro de 2017

BIANCO, S. et al. Acúmulo de massa seca e de macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Solanum americanum*. *Planta Daninha*, v. 30, n. 1, p. 87-95, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRANDT, K. et al. Importance of the intestinal microflora. *Pediatria*, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 117-127, ago. /set. 2006

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grão. v. 4 - Safra 2016/17, decimo levantamento. Em julho de 2017. Disponível em [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_07\\_12\\_11\\_17\\_01\\_boletim\\_graos\\_julho\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf) . Acesso em: 03 de nov. de 2017.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. 2016. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em 26/06/2017.

\_\_\_\_\_. Gerência de monitoração e fiscalização da propaganda, de publicidade, de promoção e de informação de produtos sujeitos à vigilância sanitária (GPROP). Guia do Projeto de Monitoração de Propaganda e Publicidade de Produtos Sujeitos à Vigilância Sanitária. Brasília: 2004, 110 p. 2004a. (Versão Dez. 2004).

\_\_\_\_\_. Informe Técnico nº 9, de 21 de maio de 2004, Orientação para utilização, em rótulos de alimentos, de alegação de propriedades funcionais de nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica (item 3.3 da Resolução ANVS/MS nº18/99). Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/09\\_210504.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/09_210504.htm)>. Acesso em: 01 de jul. de 2017.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. Institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, com a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegação de função em rótulos, submetidos por lei ao regime de vigilância sanitária. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 03 maio. 1999. Disponível em: <[http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=51&mode=PRINT\\_VERSION](http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=51&mode=PRINT_VERSION)>. Acesso em: 24 out. 2005. 1999.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 386, de 26 de setembro de 2005. Altera a denominação e a composição da Comissão instituída pela Portaria nº 15 ANVISA, de 30 de abril de 1999 para Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde e Novos Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 27 set. 2005. Disponível em: <[http://e-legis.bvs.Br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT\\_VERSION&id=18884](http://e-legis.bvs.Br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=18884)>. Acesso em: 28 out. 2005. 2005.

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. *Diário Oficial*, Brasília, 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/%2033880/2568070/rdc0054\\_12\\_11\\_2012.pdf/c5ac23fd-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864](http://portal.anvisa.gov.br/documents/%2033880/2568070/rdc0054_12_11_2012.pdf/c5ac23fd-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864)>. Novembro, 2012. Acesso em: 22 set. 2017

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 9 jan. 2002.

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 216 de 12 de novembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões de Boas Práticas de para Serviços de

Alimentação. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Cartilha+Boas+Pr%C3%A1ticas+para+Servi%C3%A7os+de+Alimenta%C3%A7%C3%A3o/d8671f20-2dfc-4071-b516-> Novembro, 2004. Acesso em: 22 set. 2017.

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial, Brasília, 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Janeiro, 2001. Acesso em: 22 set. 2017.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Anuário Estatístico 2017 Dados do desempenho das indústrias do petróleo, do gás natural e dos biocombustíveis e do sistema de abastecimento nacionais no período 2007-2016. Disponível em <http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/anuario-estatistico/3819-anuario-estatistico-2017>. Acesso em: 11 de nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução normativa n. 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

\_\_\_\_\_. Instrução normativa n. 16 de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade da bebida láctea. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 17/06/2017.

\_\_\_\_\_. Instrução normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 04 fev. 2017.

\_\_\_\_\_. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18164>>. Acesso em 18/06/2017

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações. CNPQ- Conselho Nacional de Pesquisa Tecnológica. Dia do cerrado. Disponível em [http://cnpq.br/fotos-institucionais-view/journal\\_content/56\\_INSTANCE\\_Jx0V/10157/2789900](http://cnpq.br/fotos-institucionais-view/journal_content/56_INSTANCE_Jx0V/10157/2789900). Acesso em : 12 de nov.2017.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v.61, p.160-174, 2012.

BUONO, M. A. et al. Soymilk yogurt: Sensory evaluation and chemical measurement. *Journal of Food Science*, v. 55, n. 2, p.528-531, 1990.

BURITI, F.C.A. et al. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v.15, p.1279-1288, 2005b.

CANO ANDRADE, M.H et al. Óleo do Fruto da Palmeira Macaúba Parte I: Uma Aplicação Potencial Para Indústrias de Alimentos, Fármacos e Cosméticos. *Anais do II ENBTEQ - Encontro Brasileiro sobre Tecnologia na Indústria Química*.São Paulo: ABEQ, 2006. v. 1.

CANUTO, G. A. B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, dez. 2010.

CARAZZA, L.; ÁVILA, J. C. C. Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto do baru. Brasília: ISPN, 2010.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. et al. Melhoramento de soja para alimentação humana na Embrapa Trigo – Safra agrícola 2011/2012. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. p. 27-31.

CARVALHO, K. J. et al. Ecologia, manejo, silvicultura e tecnologia da macaúba. Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa, 35 p.il. 2011

CASTILHO et al. Caracterização química da polpa de macaúba (*acrocomia aculeata*). *Journal of Fruits and Vegetables*, v. 1, n. 1, p. 45-48, 2015.

CHERY, J. et al. *Lactobacillus fermentum*, a pathogen in documented cholecystitis. *International Journal os Sugery Case Reports*. v. 4, pp. 662-664, 2013.

CICOCINI, G. Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul. Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brasil. 2012. 127 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia).

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. (2011). Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, 44, 1658–1670.

COEURET, V. et al. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotics products. *Int J Food Microbiol*. 97(2):147-156, 2004.

COIMBRA, M.C; JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) and macauba (*Acrocomia aculeata*). *J Sci Food Agric* 2012; 92: 679 e 84.

CRUZ, A. G. et al. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.

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

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, Basel, v. 15, n. 10, p.7313-7352, 2010

DALIRI, E. B.-M.; LEE, B. H. New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*, 2015.

DAMIANI, C. et al. Perfil de ácidos graxos e fatores antinutricionais de amêndoas de pequi crua e torrada. *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, v.43, n.1, p. 71-78, 2013

DAMODARAN, S. et al. *Fennema's food chemistry*. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 1144 p.

DANTAS, et al. Qualidade microbiológica de polpa de frutas comercializadas na cidade de campina grande, pb. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.14, n.2, p.125-130, 2012

DOUILLARD, F. et al. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health, *Microb. Cell Fact.*13 (Suppl. 1) 2014.

DROUAULT, S. et al. Streptococcus thermophilus is able to produce a  $\beta$  -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.2, p.938-941, 2002.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Usos da soja. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=25&cod\\_pai=29](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29)>. Acesso em: 3 abr 2017.

ESTEVES T. Desenvolvimento de alimento fermentado de soja tipo "iogurte": avaliação da estabilidade física [Master]. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2011.

FALEIRO, L.R. Viabilidade de Bifidobacterium longum 5<sup>1</sup>A e BL05 em bebidas lácteas fermentadas com diferentes culturas iniciadoras. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. 2015. 129f. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).

FAO/WHO. Probiotics in Food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In: *FAO Food and Nutrition paper* 85, 2006.

FARIAS, T. M. Biometria e processamento dos frutos da macaúba (*Acromia* sp) para a produção de óleos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010

FAVARO TRINDADE, C.S. et al. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. Arch. Lationamer. de Nutr. v. 51, n. 1, 2001.

FEITOSA, T. et al. Qualidade microbiológica de polpas de frutas produzidas comercialmente nos Estados da Paraíba e Pernambuco. Higiene Alimentar, v. 12, n. 66/67, p. 111-115, nov/dez, 1999.

FERNANDES, D.C. et al. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 90, n. 10, p. 1650-1655, 2010

FERNANDES, G.R. Aplicações tecnológicas atuais e potenciais no mercado para alimentos probióticos. Sete Lagoas. Universidade Federal de São João del Rei, 2013. 43p. (Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharel em Biosistemas).

FERREIRA, A. N. et al. Utilização do extrato de macaúba (*Acrocomia aculeata*) como um alimento funcional do tipo “shake”. Revista Interbio, Dourados, v. 7, n. 1, p. 61-71, 2013

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas e Aplicação Tecnológica de Bactérias Probióticas. In: Prebióticos e Probióticos – Atualização e Prospecção. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012. 226p

FERREIRA, C. L. L. F. Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos. In: PORTUGAL, J.A.B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F. (Ed.). O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais. Juiz de Fora: EPAMIG – Centro Tecnológico – ILCT, 2001. p. 183-203.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], pp. 109-112. Disponible en: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.

FIORAMONTI, J. et al. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology, v.17, p.711-724, 2003

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). World Health Organization (WHO). FAO Food nd Nutrition Paper. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. v.85, p.1-4, 2001.

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

FREITAS, M.R., Avaliação da Adequação de Rotulagem Para os Alimentos com Alegação de Propriedade Funcional: Fibras Alimentares. Brasília. Universidade de Brasília. 2014. p. 58. (Dissertação).

FUCHS, R.H.B. et al. "iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. Ciênc. Tecnol. Aliment., v.25, n.1, p.175-181, 2005

GAMA; J.J.T. and SYLOS C.M., Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia Orange Juice. FoodChem100:1686–1690, 2007.

GARCIA, M. C. et al. Chemical characterization of commercial soybean products. Food Chemistry, v. 62, p. 325-331, 1998

GARRIDO, A. et al. Soy isoflavones affect platelet thromboxane A2 receptor density but not plasm lipidsin menopausal women.Maturitas.v.54, n.3, p.270-276, 2006.

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

GIANEZINI, M. et al. Diferenciação de produto e inovação na indústria agroalimentar: a inserção de alimentos funcionais no Brasil. RACE - Revista de Administração, Contabilidade e Economia, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 9-26, ago. 2012. ISSN 2179-4936. Disponível em: <<https://editora.unoesc.edu.br/index.php/race/article/view/1540>>. Acesso em: 26 Jun. 2017.

GÓES-FAVONI, S. P. et al. Isoflavonas em produtos comerciais de soja, Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 24, p. 582-586, 2004.Reunião de Pesquisa de Soja (36. : 2017 : Londrina, PR) Resumos expandidos [da] XXXVI Reunião de Pesquisa de Soja / Alvadi Antonio Balbinot Junior, Fernando Augusto Henning, Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite, editores técnicos. [recurso eletrônico] – Londrina: Embrapa, 2017.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. Bol. Biotecnol. Al., São Paulo, n. 64, p. 12-22, 1999.

GORBACH, S.L. Probiotics and gastrointestinal health. American Journal of Gastroenterology, v.95, n.1, suppl., p.S2-S4, 2000

GRANT, G. Anti-nutricional effects of soybean.a review. Progress in Food and Nut. Sci., v.13, p.317-348.1989.

GRAY, M.; KUNZE, H. Acrocomia aculeate. Brisbane: Palm and Cycad Societies of Australia. Disponível em: <[http://www.pacsoa.org.au/w/index.php?title=Acrocomia\\_aculeata](http://www.pacsoa.org.au/w/index.php?title=Acrocomia_aculeata)>. Acesso

em: 28 de nov. 2016. Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

GUARNER, F. et al. Should yogurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, v.93, p.783-786, 2005.

GUARNER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. *The Lancet*, v.360, p.512-519, 2003

HAMACEK, F.R. Caracterização física, química e valor nutricional de espécies frutíferas do cerrado de minas gerais 2012. UFV. Viçosa. MG.p. 66. (Dissertação).

HASSIMOTTO, N. M. A. Atividade Antioxidante de Alimentos Vegetais: Estrutura e Estudo de Biodisponibilidade de Antocianinas de Amora Silvestre (*Morus sp.*). 2005. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HAULY, M.C.O. et al. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Rev. Nutr.*, v.18, n.5, 2005.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v.11, p.506–514, 2014

HO, C. et al. Substâncias biotivas: nutracêuticas e tóxicas In: DAMADARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 585-588

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. São Paulo: Manole, 2007. p. 697-731.

HOU, J. W. et al. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International*, v. 33. p. 393-397, 2000.

IKEDA, A. A. et al. Considerações sobre Tendências e Oportunidades dos Alimentos Funcionais. *Revista P&D Engenharia de Produção*, v. 08, n. 02, p.40-56, 2010.

JAIN P.K. et al. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La 5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clinical Nutrition*, v.23, n.4, p.467-75, 2004.

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

JUNTUNEN, M. et al. Adherence of Probiotic Bacteria to Human Intestinal Mucus in Healthy Infants and during Rotavirus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001;8(2):293-296. doi:10.1128/CDLI.8.2.293-296.2001.

KAWANISHI, S. et al. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*, San Diego, USA, v. 32, p. 822-32, 2002.

KOPPER, A. C. Bebida simbiótica elaborada com farinha de Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) e *Lactobacillus acidophilus* incorporadas ao extrato hidrossolúvel de soja. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009. 79 p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).

KUSKOSKI, E. M. et al . Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas , v. 25, n. 4, p. 726-732, Dec. 2005 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612005000400016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400016&lng=en&nrm=iso)>. access on 08 Mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>.

KUSKOSKI, E.M. et al. Frutas tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, v.36, p.1283-1287, 2006.

LAGUERRE, M. et al. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. *Progress in Lipid Research*, v. 46, p. 244-282, 2007.

LAJOLO, F.M., Functional foods: Latin American perspectives, *British Journal of Nutrition* (2002), 88, Suppl. 2, S145–S150 12.

LEANDRO, E.S. et al. Efeito de protetores e tratamentos de estresse na sobrevivência de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ao congelamento. *Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”*, Jan/Fev, nº 390, 68: 37-40, 2013.

LIM, Y. Y., Lim, T. T., & Tee, J. J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103(3), 1003–1008.

LIRA, F. F. et al. Avaliação da composição centesimal de frutos de macaúba. In: *Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia*. 3. Anais. Londrina, 2013.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, v. 134 n. 12, p. 3479-3485, 2004.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Lodd. ) ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Tese. Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba: 2006.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*, Amsterdam, v.34, n.9, p.791-796, 2001

MA, A. T. M. H. et al. 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, M. R. G. Bebida de soja fermentada com *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional. 2007. 101f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas - UFPEL, Pelotas, 2007

MACHADO, M. R. G.; et al. Fermentado de soja com potencial probiótico. Qualificação de doutorado apresentado no DCTA/UFPeL, 2006.

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, v. 70, p. s85-s90, 2005

MAISUTHISAKUL, P. et al. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007

MALTA, D. C. et al. A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.15, n.3, p.47-65. ISSN 1679-4974, 2006.

MALTA, L. G. et al. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. *Food Research International*, Essex, v. 49, n. 1, p. 604-611, 2012

MANZANO, G. P. P. et al. Aspectos sensoriais e físico-químicos de “iogurtes” de soja com espessantes/estabilizantes a base de fécula de inhame (*Dioscorea alata*), amido modificado e gelatina. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 287- 296, jul./dez. 2008.

MARFO, E. K. et al. 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

MARIN, M. et al. Caracterização físico-química e sensorial de bebida probiótica de soja. *B. CEPPA*, Curitiba, v. 32, n. 1, p. 93-104, jan./jun. 2014.

MARTINEZ, R.C.R. et al. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition* v.114, p. 1993-2015. 2015.

MARTINS, G.H. et al. Perfil físico-químico, sensorial e reológico de iogurte elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e suplementado com inulina. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.15, n.1, p.93-102, 2013 ISSN 1517-8595.

MATER, D.D.G. et al. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiology Letters*, v. 250, p.185-187, 2005

MCNAUGHT, A. P. K. et al. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La 5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clinical Nutrition*, v.23, n.4, p.467-75, 2004

MCNULTY, H. P. et al. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1768, n. 1, p. 167-174, 2007.

MICHETTI, P. et al. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*, v.60, p.203-209, 1999.

MIRANDA, I.P.A. et al. *Frutos de Palmeiras da Amazônia*. Manaus: MCT INPA, 2001. p. 7-10.

MONTANARI, M. *Comida Como Cultura*, 207 p., Editora Senac, São Paulo, 2008

MOO-HUCHIN, V. M. et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, v. 16, p. 17–22, 2015.

MORAES, R. M. 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

MORAES, R. M. et al. Efeito da desodorização nas características sensoriais de extratos hidrossolúveis de soja obtidos por diferentes processos tecnológicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p.46-51, 2006.

MORAIS, F. L. *Carotenoides: características biológicas e químicas*. 2006. 60 p. Especialização em Qualidade em Alimentos. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006

NASCIMENTO, A. R. et al. Perfil microbiológico de polpas de acerola (*Malpighia glabra*) e abacaxi (*Ananas comosus*), produzidas e comercializadas na ilha de São Luís, MA. *Higiene Alimentar*, v. 13, n. 62, p. 44-47, 1999.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), 4 ed, Campinas: NEPA– UNICAMP, 2011. Disponível em: < <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>. Acesso em: 01 jul. 2012.

NEVES, L. C. Frutos- O remédio do futuro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 34, n.4 p. i. , 2012.

NICOLI, J.R.et al. Probióticos: experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F., ed. *Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p.123-133

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010

NITZKE, J. A. Alimentos funcionais – uma análise histórica e conceitual. Capítulo publicado no livro “Agronegócio: panorama, perspectivas e influência do mercado de alimentos certificados”. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Curitiba, p. 11-23, 2012.

OLIVEIRA, D. L.; ROCHA, C. Alternativas sustentáveis para a merenda escolar com o uso de plantas do cerrado, promovendo educação ambiental. *Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental*, Rio Grande, v. 21, p. 35-53, 2008

OLIVEIRA, M. N. et al. 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, R.P.S. O efeito da composição de cultura e suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado. São Paulo. 2009. Universidade de São Paulo. 170 p. (Tese, Doutorado).

OLIVEIRA, W. L; SCARIOT, A. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. Disponível em: <http://www.ispn.org.br/>. Acesso em: 08 agost. 2016.

OMURA, M. H. Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano / Michele Harumi Omura. – Viçosa, MG, 2014.xiv, 149f:

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

PANT, N. et al. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. *Microbiology*, v. 7, n. 86, p. 1-9. 2007.

PARVEZ K.A et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Bacteriol.* 100:1171-85.2006.

PAULA, S.A. Composição bioquímica e fatores antinutricionais de genótipos de soja. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007 74 p. (Dissertação, Mestrado Bioquímica Agrícola).

PEREIRA, B.S. Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de bifidobactérias durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Departamento de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012

PEREIRA, M. O. et al. Elaboração de uma bebida probiótica fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja com sabor de frutas. *Ambiência*, Guarapuava, v. 5, n. 3, p. 475-487, 2009.

PIMENTEL, C. V. M. B. et al. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 95p

PLÁ, J. V. A. Industrialização e transição demográfica no Brasil. *Revista Economia & Tecnologia (RET)*, v. n. 91, p. 61-78, Jan/Mar 2013.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol*, v. 40, p. 1-11, 2007

POKUSAEVA, K. et al. Carbohydrate metabolism in bifidobacteria, *Genes Nutr.* 6 (2011) 285-306.

PRADO, E. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. 2009. 106f. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PULIDO, R. et al. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agri. Food chem.*, 48: 3396-3402. 2000.

PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO, Campinas, 2002. p.133-145. [Alimentos funcionais e Biotecnologia]

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science & Technology*, v.13, p.3- 11, 2002

PYAR, H.; PEH, K. Effect of cryoprotective agents on survival and stability of *Lactobacillus acidophilus* cultured in food-grade medium. *International Journal of Dairy Technology*, Huntingdon, v. 64, n. 4, p. 578 -584, 2011

QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 97-111, 2006

RAMOS, M. I. L. Polpa de bocaiúva (*Acrocommia aculeata* (Jacq.) Lodd.): composição química e biodisponibilidade de carotenóides. 2007. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília/Universidade Federal de Goiás/Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasília, 2007

RAMOS, M. I. L. et al. A Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, supl., p. 90-94, 2008

RANADHEERA, R. D. C. S. et al. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43,1e7.

REID, G. et al. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.37, n.2, p.105-118, 2003

RIQUETTE, R.F.R. Bebidas fermentadas probióticas à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionadas de mel de abelha: desenvolvimento, avaliação sensorial e determinação da vida de prateleira. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.172 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

RIVERA, S.M.; GARAYOA, R.C. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of chromatography A*. v. 1224. p. 1-10. 2012.

ROCHA, M. S. et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado piauiense. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 35, n. 4, p. 933-941, 2013.

RODRIGUES, L. J. O pequi (*Caryocar brasiliense*): ciclo vital e agregação de valor pelo processamento mínimo. 2005. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, MG, 2005

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. et al. Functional foods and optimum nutrition: A way or away? *Revista. Española de Salud Pública*, v. 77, n. 3, p. 317-331, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1999). *A guide to carotenoids analysis in food*. Washington: ILSI Press.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. et al. *Fontes brasileiras de carotenóides: Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. et al. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Annals of Botany*, Rome, v.40, p.615-624, 1976.

ROSSI, E. A.; et al. Development of novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *European Food Research and Technology*, v. 209, p. 305 - 307, 1999.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. Amsterdam, n. 121, p. 996–1002, 2010.

RUFINO, M. S. M. et al. *Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)*. Fortaleza: EMBRAPA, 2007c. 4 p. (Comunicado Técnico, 125).

RUFINO, M. S. M. et al. *Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+*. Fortaleza: EMBRAPA, 2007b. 4 p. (Comunicado Técnico, 128).

RUFINO, M. S. M. et al. *Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. Fortaleza: EMBRAPA, 2007a. 4 p. (Comunicado Técnico, 127).

RUFINO, M. S. M. et al. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. *Food Research International*, n. 44, p. 2072-2075, 2011

SAAD, M. I. S. et al. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A.F *Probióticos e Prebióticos em Alimentos. Fundamentos e Aplicações tecnológicas*. São Paulo: Livraria Varela, 2011. p. 23-49.

SANCHO, R.A. S.; PASTORE, G.M. Alimentos funcionais:A revolução silenciosa na alimentação. *Revista Processos Químicos*, v. 19, p.13-24, 2016.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.84, p.319-331, 2001.

SANTOS JÚNIOR, J. F. et al. *Bocaiuva, macaúva, macaúba, bocajá: técnicas e dicas de aproveitamento*. Campo Grande: ECOA, 2012. 44 p.

SANTOS, K. P. 2014. *Croton sphaerogynus* Baill.: substâncias fenólicas e atividades biológicas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 70p.

SANTOS, C.A.A. et al. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(4): 913-915, out.-dez. 2008.

SANTOS, F. A. et al. Análise qualitativa de polpas congeladas de frutas produzidas pelo SUFRUTS, MA. *Higiene Alimentar*, v. 15, n. 119, p. p. 14-22, 2004.

SANTOS, G. M. et al. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 58, n. 2, p. 187–192, 2008

SCALDAFERRI, F. et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 435268.

SCHULKA, A.C.; COLLA, E.X. Alimentos funcionais e suas perspectivas no mercado brasileiro. *Food Ingredientes* numero 30. 2014

SEPTEMBRE-MALATERRE, A. et al. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. *Food Chemistry*, v. 212, p. 225–233, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.147>>.

SERVIN, A.L.; COCONNIER, M.H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v.17, n.5, p.741-754, 2003

SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, p. 403- 427, 2004

SIKORA, E. et al. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, London, v. 107, p. 50-55, 2008

SILVA, D.B et al. *Frutas do cerrado*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 179p

SILVA, J. C. Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial. Viçosa: Departamento de Engenharia Florestal, UFV, 2007. 63 p

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010

SILVA, M. S. et al. Composição química e valor proteico de resíduo de soja em relação ao grão de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000300014>.

SILVA, M.R. et al. Caracterização química de frutos nativos do cerrado/Chemical characterization of native species of fruits from savanna ecosystem. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.6, p.1790-1793, set, 2008.

SILVEIRA, N.D.P. O emprego da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento de um novo produto simbiótico, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, à base de extratos aquosos de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Araraquara. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2009, 122p. (Dissertação, Mestrado em Alimentos e Nutrição).

SIQUEIRA, P. B. Caracterização bioquímica e compostos bioativos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.). 2012. 148 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SIRÓ, I. et al. Functional food: product development, marketing and consumer acceptance: a review. *Appetite*, London, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008. PMID:18582508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>

SOARES, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 28, n. 3, p. 727-732, 2008.

SOUZA, P. H. M. et al. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SOUZA, V. R, et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–368, 2014.

SOUZA, V. R. de et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, Amsterdam, n.134, p. 381–386, 2012.

STRINGHETA, P. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades

funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 2, 2007.

TRINDADE, C. S. F. et al. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. *Archives Latinoamericanos of Nutrition*, v. 51, n. 1, p. 100-104, 2001.

TURNBAUGH, P. et al. The human Microbiome Project, *Nature*. 449 (2007) 804-810.

UENOJO M. et al. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*. v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007

UMBELINO, D.C.; ROSSI. E.A.; Aspectos tecnológicos e sensoriais do “iogurte” de soja enriquecido com cálcio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 21, p. 276-280, 2001.

UNTUNEN, M. et al. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.8, n.2, p.293-296, 2001.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Low molecular weight pro- antioxidants and antioxidants from diet: structure and function. *Nutrire, São Paulo*, v. 31, n. 3, p. 95-118, dez. 2006.

VERSALOVIC, J. The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics, *Ann. Nutr. Metab.* 63 (suppl 2) (2013) 42-52.

VESTERLUND, S. et al. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International Journal of Food Microbiology*. v. 116, pp. 325–331, 2007

VIDAL, A. M. et al. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. *Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT*, v. 1, n. 1, p. 43-52, out. 2012.

VIEIRA, R. F. et al. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF*, Cap. 15, p. 248-287, 2006.

VINDEROLA, C. G., REINHEIMER, J. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v.10, p.271-275, 2000.

VIZZOTTO, M. et al. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal*, v. 34, n. 3, p. 853-858, Sept. 2012. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-)

29452012000300027&lng=en&nrm=iso>. access on 23 Nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000300027>.

WALL, R. et al. Role of gut microbiota in early infant development. *Clinical Medicine: Pediatrics, Auckland*, v. 3, p. 45-54, mar. 2009.

WANG, K. et al. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric allergy and immunology, Copenhagen*, v. 15, n.2, p. 152- 158, 2004.

WANG, S.H. et al. Produção de iogurte de soja com diferentes associações de bactérias lácticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 29, n. 10, p. 1539-1601, 1994.

WATERHOUSE, A. L. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R.E. *Current Protocol in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2002. Cap.1.1, p. 1.1.1-1.1.8.

WILLE, G. M. F. C. et al. 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,

YOUNG, R.J.; HUFFMAN, S. Probiotic use in children. *Journal of Pediatric Health Care*, v.17, n.6, p.277-283, 2003

YUYAMA, L. K. O. et al. Vitamina A (Retinol) e carotenóides. In: COZZOLINO, S. M. F. *Biodisponibilidade de nutrientes*. São Paulo: Manole, 2007. p. 219-261.

ZANATTA, S. Caracterização da macaúba (casca, polpa e amêndoa) e análise sensorial através da Educação do Gosto. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo Piracicaba, 2015. 107 p.: il..

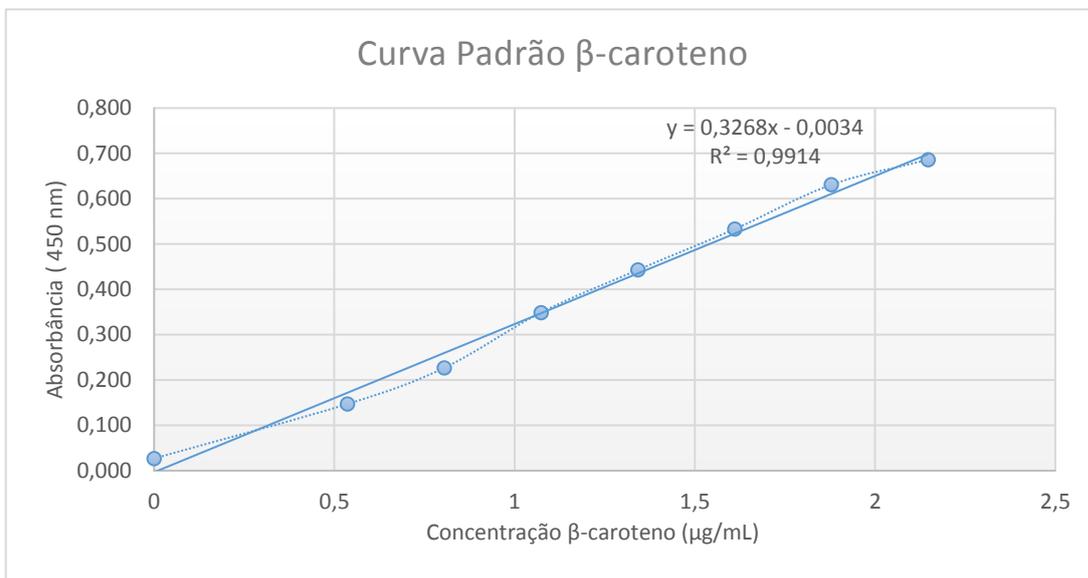
ZHANG, G. et al. The effect of cold, acid and ethanol shocks on synthesis of membrane fatty acid, freeze-drying survival and malolactic activity of *Oenococcus oeni*. *Annals of Microbiology, Heidelberg*, v. 62, n.2, p. 1-9, 2012. doi: 10.1007/s13213-012-0492.

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

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 473-479, 1998.

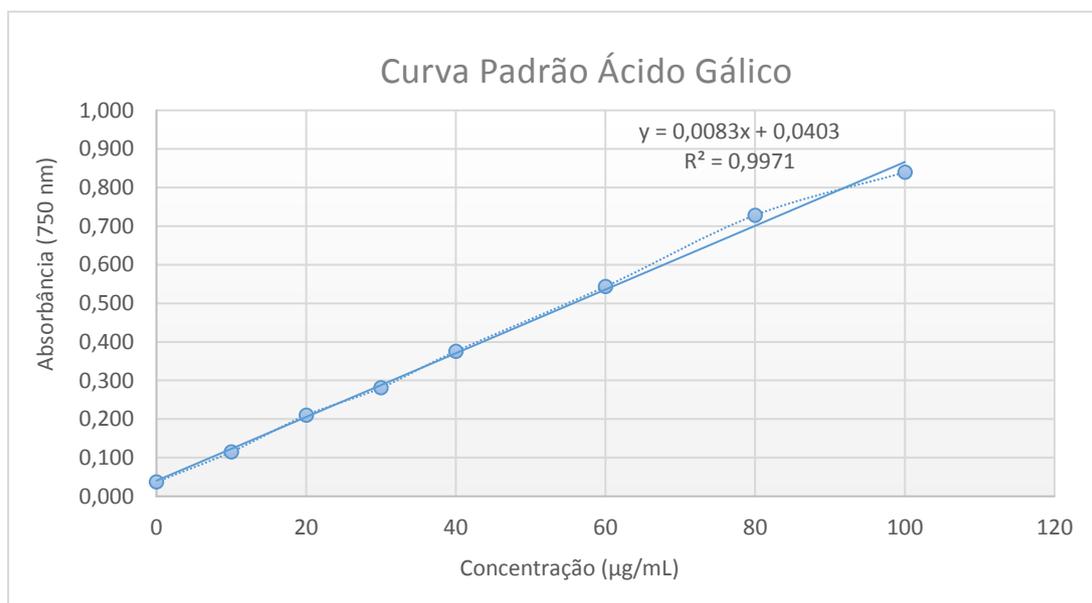
## 9. ANEXOS

### Anexo 1- Curva padrão de $\beta$ -caroteno

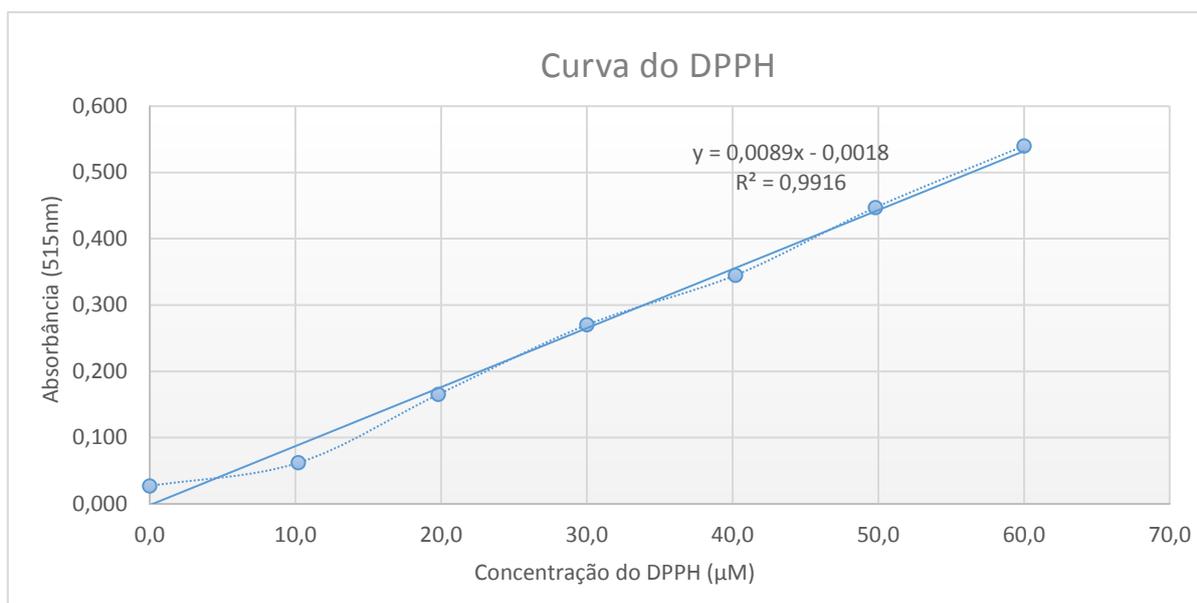


Fonte: o autor, 2017

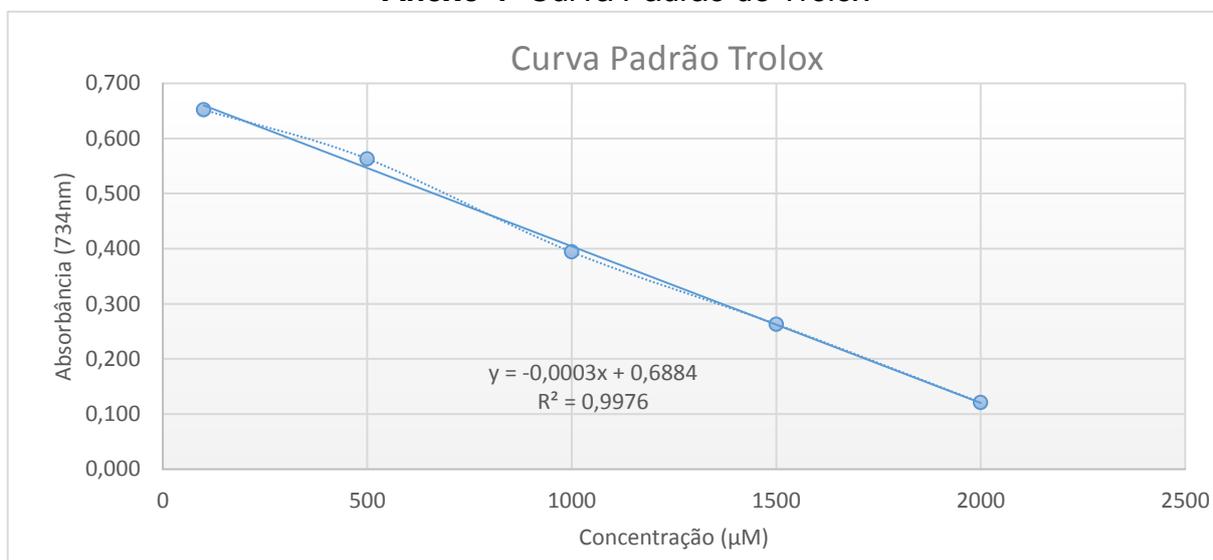
### Anexo 2- Curva Padrão de Ácido Gálico



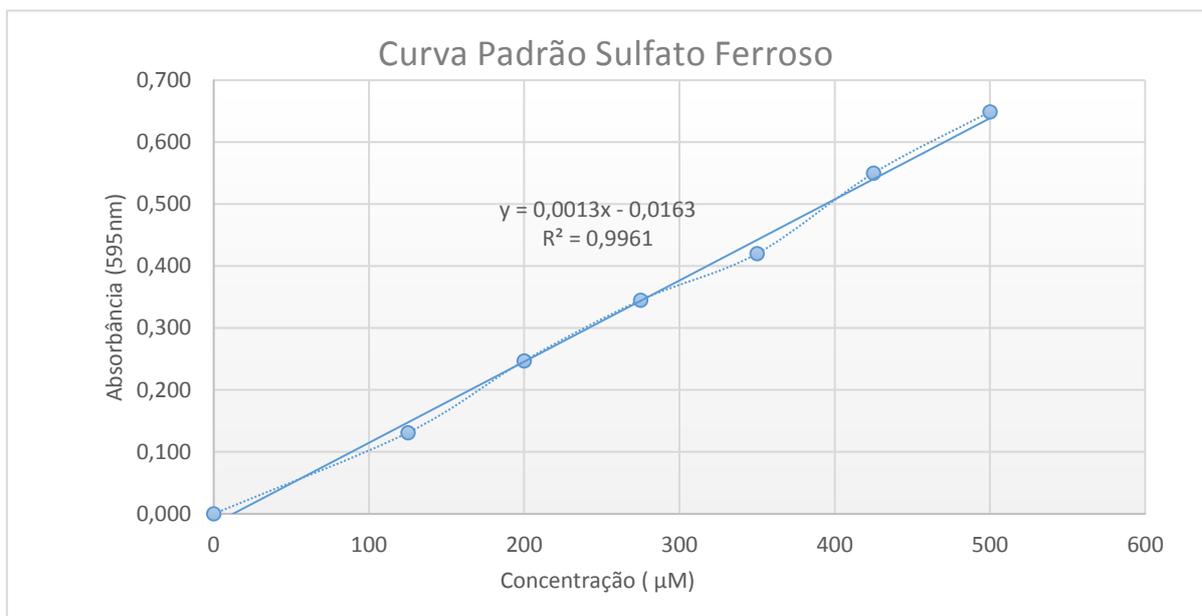
Fonte: o autor, 2017

**Anexo 3- Curva Padrão de DPPH**

Fonte: o autor, 2017

**Anexo 4- Curva Padrão de Trolox**

Fonte: o autor, 2017

**Anexo 5- Curva Padrão de Sulfato Ferroso**

Fonte: o autor, 2017