

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ROBERTA FIGUEIREDO RESENDE RIQUETTE

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
2013

ROBERTA FIGUEIREDO RESENDE RIQUETTE

BEBIDAS FERMENTADAS PROBIÓTICAS À BASE DE EXTRATO
HIDROSSOLÚVEL DE SOJA ADICIONADAS DE MEL DE ABELHA:
DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO SENSORIAL E DETERMINAÇÃO DA VIDA DE
PRATELEIRA

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 título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Professora Doutora Evelyn de Souza Oliveira Lopes/ UFMG

Co-orientadora: Professora Doutora Inayara Cristina Alves Lacerda/ UFMG

Belo Horizonte
2013

Riquette, Roberta Figueiredo Resende.
R594b Bebidas fermentadas probióticas à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionadas de mel de abelha: desenvolvimento, avaliação sensorial e determinação da vida de prateleira / Roberta Figueiredo Resende Riquette. – 2013.
172 f. : il.

Orientadora: Evelyn de Souza Oliveira Lopes.
Co-orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.

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

1. Soja – Teses. 2. Extrato hidrossolúvel de soja – Teses. 3. Bebidas fermentadas – Teses. 4. Probióticos – Teses. 5. Prebióticos – Teses. 6. Mel de abelha – Teses. I. Lopes, Evelyn de Souza Oliveira. II. Lacerda, Inayara Cristina Alves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 664.07



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

ROBERTA FIGUEIREDO RESENDE RIQUETTE

**BEBIDAS FERMENTADAS PROBIÓTICAS À BASE DE EXTRATO
HIDROSSOLÚVEL DE SOJA ADICIONADAS DE MEL DE ABELHA:
DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO SENSORIAL E DETERMINAÇÃO
DA VIDA DE PRATELEIRA**

APROVADA EM 30 DE AGOSTO DE 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Elizabeth Neumann
Profa. Dra. ELIZABETH NEUMANN

Evelyn de S. Oliveira Lopes
Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES
(Orientadora e Presidente da Comissão)

Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière
Profa. Dra. LÚCIA HELENA ESTEVES DOS SANTOS LABOISSIÈRE

Dedico este trabalho à minha querida família que são sinônimo de união, parceria, amizade e amor incondicional pra mim. Em especial, aos meus pais e irmãos que são, simplesmente, tudo em minha vida. Melhor presente que Deus poderia ter me enviado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço este trabalho, primeiramente, a Deus! Sem Ele em minha vida, jamais teria conseguido chegar até aqui. É Ele quem me dá forças para superar todos os obstáculos diários e a evoluir cada vez mais no caminho do bem. É indescritível o tamanho da Sua presença em minha vida.

Agradeço à minha linda família! Tios, primos, avós! Pelo apoio, suporte e carinho durante toda esta trajetória. Em especial aos meus queridos e amados avós Norma e Edgard. Esse, em especial, pelo forte pensamento positivo que tenho certeza de que auxiliou a minha chegada até aqui e pelas inúmeras orações para o cumprimento com êxito desta etapa da minha vida. Obrigada pelo carinho!

Agradeço imensamente aos meus pais! Pai, mãe e mãe de coração! Obrigada, Querida, por todo o carinho, afeto e proteção, como se fosse sua filha “de verdade”. Obrigada, mãe, pela imensa presença, de corpo e alma, durante todo este caminho. Por ser meu anjo da guarda, me reerguendo e me consolando em momentos difíceis e por estar presente comemorando comigo a cada etapa vencida. Pai, um agradecimento mais do que especial vai a você. Sem você, sem o seu apoio, sua confiança e insistência para eu tentar o mestrado na UFMG, nada disso teria sido possível. Você confiou em mim mais do que qualquer outra pessoa. Por você tentei a prova e por você estou aqui hoje. Obrigada, de coração! Agradeço também à minha Tia Beth, mãezona mais do que especial! Você tem participação na concretização desta etapa por tudo que foi e é em minha vida! Por todo o exemplo, ensino e educação que me foram me dados. Obrigada por ter me ensinado valores que são essenciais na vida e no desenvolvimento humano!

Agradeço aos meus irmãos! Melhores amigos desse mundo. Meus companheiros, confidentes e cúmplices. Se Deus tivesse me concedido o poder de escolher meus próprios irmãos para caminhar comigo nesta vida, eu teria escolhido exatamente vocês cinco. É uma ligação tão forte que, mesmo distante uns dos outros, sinto vocês sempre por perto. Obrigada por alegrarem imensamente a minha vida!

Agradeço também a todos os meus amigos! Em especial, Nêssa e Dê. Nêssa, sei que sempre torceu e torce por mim para que o melhor aconteça em minha vida. Independente de onde estivermos, sei que sempre estará por perto porque a sua presença é muito grande dentro de mim. Obrigada pelo apoio incondicional, irmãzinha! Dê, obrigada por sempre me trazer alegria nos momentos em que estou triste. Durante esta etapa foram vários e, mesmo você não sabendo quais eram, me trazia felicidade através de uma simples mensagem virtual descontraída, mesmo que me amolando. Ter sua amizade é um privilégio pra mim!

Agradeço também aos amigos de laboratório, pela companhia na luta diária. Por vibrarem comigo a cada fase vencida! Ao Cosme, pelos vários momentos que me fez rir com seu bom humor sem igual. À Elaine, pela imensa prestatividade e ajuda, principalmente na etapa da análise sensorial. À Flávia, aluna de iniciação científica que foi, literalmente, meu braço direito nas etapas finais e, conseqüentemente, mais difíceis do trabalho. À Raimunda pelas várias vezes em que me auxiliou ao lavar minhas vidrarias otimizando bastante meu tempo para os estudos. À Ana Diolina pela amizade e pelo conhecimento que me foi compartilhado todas às vezes em que eu precisei de suporte. À Beatriz, querida Bia, por ter me inserido no laboratório, ter me ensinado com muita paciência todos os procedimentos laboratoriais e, ainda, por ter estado sempre à disposição para compartilhar seu conhecimento e esclarecer as minhas dúvidas. Um agradecimento mais do que especial à Lu, um anjo que me iluminava em todos os momentos em que eu precisava de uma luz. Minha orientadora particular! Companheira de todas as horas e sempre pronta a ajudar a todos. Obrigada por toda a paciência, por ter estado sempre presente durante o trabalho e, principalmente, por todos os ensinamentos que me proporcionou!

Agradeço também às companheiras do LAMIB Andréa, Carla, Denise, Fernanda, Flávia, Letícia e Michelly pelas preciosas sugestões e por ter tornado o trabalho mais alegre e agradável.

Agradeço às minhas queridas orientadoras Evelyn e Inayara! Primeiramente pela oportunidade única que me proporcionaram! Por terem aceitado a percorrer comigo o caminho em direção à realização deste meu sonho. Obrigada pela amizade, pelo apoio, pelo carinho, pela confiança e pela paciência que vocês tiveram comigo

durante todo esse tempo. Agradeço também o imenso conhecimento que me foi passado! Com vocês aprendi de tudo. Tanto de microbiologia, laboratório, carreira acadêmica, como também de solidariedade, de amor ao próximo, de ser paciente e de ser humanista acima de tudo. Obrigada por todo o companheirismo desses anos!

Agradeço à Aline, à Nathália e à Prof^a Lúcia que, mesmo de longe, prestou grande contribuição ao trabalho! Todas foram imprescindíveis para a realização da etapa da análise sensorial. Obrigada pela enorme ajuda, presteza, boa vontade e disposição em nos ajudar! Sem vocês esta etapa não teria sido realizada. Obrigada!

Agradeço à Prof^a Cláudia por disponibilizar o Laboratório de Análises Físico-químicas na Escola de Veterinária da UFMG. Obrigada também ao imenso suporte que me foi prestado pelo técnico deste laboratório, o Marco Antônio. Me ensinou todas as técnicas com muita paciência e de forma bastante esclarecedora e didática.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Ciência de Alimentos pela grande contribuição em minha formação científica através das disciplinas cursadas. Agradeço em especial à professora Roseane pelas valiosas sugestões como parecerista deste trabalho na apresentação da disciplina de Seminários, ao Professor Gecernir pela conversa bastante esclarecedora sobre a questão relacionada ao mel de abelha, às professoras Raquel e Renata pelo auxílio no levantamento de documentos que eram imprescindíveis para a submissão do projeto ao comitê de ética (COEP).

Agradeço à empresa alimentícia OLVEBRA® pelo fornecimento dos extratos de soja em pó e à empresa LACTOSOJA® pelo fornecimento da emulsão e base mascarante para produtos à base de soja.

Agradeço também a CAPES por ter financiado os meus estudos durante toda a trajetória me proporcionando esta experiência única e contribuindo imensamente para a minha formação profissional.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho independente da grandeza da contribuição. Meu sincero agradecimento!

"É exatamente disso que a vida é feita... de momentos! Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca nos esquecendo do mais importante: NADA nesta vida é por acaso! Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, sempre da melhor forma possível. Porque a vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser."

Mestre Chico Xavier.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	11
	LISTA DE FIGURAS	14
	LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	18
	RESUMO	20
	ABSTRACT	22
1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS	27
2.1.1	Histórico e legislação.....	28
2.1.2	Substâncias com alegações aprovadas.....	30
2.1.3	Características dos alimentos funcionais.....	31
2.2	TRATO GASTROINTESTINAL E SUA MICROBIOTA	31
2.3	PROBIÓTICOS	33
2.3.1	Principais micro-organismos utilizados como probióticos.....	34
2.3.2	Principais critérios para seleção de probióticos.....	37
2.3.3	Efeitos benéficos à saúde e recomendação de ingestão de probióticos.....	37
2.3.4	Mecanismo de ação dos probióticos.....	39
2.4	PREBIÓTICOS	40
2.4.1	Mecanismo de ação dos prebióticos.....	41
2.4.2	Efeitos benéficos à saúde e recomendação de ingestão de prebióticos.....	41
2.4.3	Principais critérios para classificação como prebióticos.....	42
2.5	MEL DE ABELHA	43
2.6	SIMBIÓTICOS	47
2.7	EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA	49
2.8	VIDA DE PRATELEIRA	51
2.8.1	Vida de prateleira de leites fermentados à base de EHS.....	52
2.9	ANÁLISE SENSORIAL	54
2.10	METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS FERMENTADAS	58
2.10.1	Processo fermentativo.....	58
2.10.2	Definição de fermentação.....	59
2.10.3	Bactérias lácticas e a fermentação láctica.....	59
2.10.4	Vias fermentativas.....	60
2.10.5	Metodologia de produção do EHS (“leite” de soja).....	61
2.10.6	Metodologia usual de produção do “iogurte” de soja.....	62
2.10.7	Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) de alimentos com soja.....	63
2.10.8	Metodologia de produção de EHS fermentado por lactobacilos probióticos.....	63
3	MATERIAL E MÉTODOS	64
3.1	MATÉRIA PRIMA	64
3.2	CULTURAS PROBIÓTICAS	65
3.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATÉRIAS-PRIMAS	65
3.3.1	Análises microbiológicas.....	65
3.3.2	Análises físico-químicas.....	66
3.4	DESENVOLVIMENTO DAS BEBIDAS FERMENTADAS	66

3.4.1	Contagem e padronização dos inóculos de <i>L.acidophilus</i> e <i>L.casei</i>	66
3.4.2	Tratamento térmico do mel de abelha.....	66
3.4.3	Formulação das bebidas fermentadas.....	67
3.4.4	Processo fermentativo.....	69
3.4.5	Fluxograma de produção das bebidas fermentadas.....	70
3.4.6	Monitoramento do processo fermentativo das bebidas à base de EHS....	70
3.5	ANÁLISE SENSORIAL DAS BEBIDAS FERMENTADAS	71
3.5.1	Público alvo.....	71
3.5.2	Testes de aceitação e intenção de compra.....	72
3.6	ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DAS BEBIDAS	75
3.6.1	Delineamento experimental da vida de prateleira.....	76
3.6.2	Avaliação dos parâmetros físico-químicos e viabilidade das culturas probióticas das bebidas fermentadas durante a vida de prateleira.....	76
3.6.2.1	Potencial hidrogeniônico (pH).....	76
3.6.2.2	Acidez total titulável (ATT).....	77
3.6.2.3	Quantificação total de células probióticas.....	77
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NAS BEBIDAS FERMENTADAS...	77
4.1.1	Extrato de soja em pó.....	77
4.1.2	Mel de abelha.....	80
4.2	CONTAGEM E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	82
4.3	FERMENTAÇÃO DO EHS	86
4.3.1	Fermentações sem adição do mel de abelha.....	88
4.3.1.1	Curvas de acidez e pH dos ensaios de fermentação.....	88
4.3.1.2	Acidez total titulável e pH.....	91
4.3.2	Fermentações com adição do mel de abelha.....	92
4.3.2.1	Curvas de acidez e pH dos ensaios de fermentação.....	92
4.3.2.2	Acidez total titulável e pH.....	95
4.4	VIABILIDADE DAS LINHAGENS PROBIÓTICAS NAS BEBIDAS	97
4.4.1	Bebidas controle (sem adição de mel de abelha).....	98
4.4.2	Bebidas com adição de mel de abelha.....	99
4.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS FERMENTADAS	101
4.6	ANÁLISE SENSORIAL DAS BEBIDAS FERMENTADAS	103
4.7	ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DAS BEBIDAS FERMENTADAS	126
4.7.1	Análise de acidez total e pH.....	126
4.7.2	Viabilidade das culturas microbianas.....	129
5	CONCLUSÃO	136
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
	APÊNDICES	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição nutricional média do mel (g/100g).....	41
Tabela 2	Formulação das bebidas fermentadas a base de EHS a 6% com a adição de mel antes da fermentação.....	66
Tabela 3	Formulação das bebidas fermentadas a base de EHS a 6% com a adição de mel depois da fermentação.....	66
Tabela 4	Delineamento experimental para o estudo da vida de prateleira das bebidas fermentadas à base de extrato hidrossolúvel de soja.....	154
Tabela 5	Análises microbiológicas da matéria prima extrato de soja de três diferentes lotes.....	76
Tabela 6	Análises físico-químicas da matéria prima extrato de soja.....	78
Tabela 7	Análise de esporos de bactérias mesófilas anaeróbicas da matéria prima “mel de abelha”.....	78
Tabela 8	Média e desvio padrão das contagens do inóculo em número de células viáveis dos micro-organismos probióticos (Christian Hansen®).....	81
Tabela 9	Variáveis que interferem significativamente no tempo de fermentação (temperatura e inóculo) de trabalhos envolvendo o processo fermentativo do EHS pelo micro-organismo probiótico <i>L.acidophilus</i>	88
Tabela 10	Variação da acidez total titulável (ATT), em % de ácido láctico, em função do tempo das bebidas fermentadas pelo <i>L.acidophilus</i> e <i>L.acidophilus</i> com <i>L.casei</i> , sem a adição do mel de abelha.....	156
Tabela 11	Variação de pH e acidez total titulável (ATT), em % de ácido láctico, em função do tempo das bebidas fermentadas pelo <i>L. casei</i> sem a adição do mel de abelha.....	156

		13
Tabela 12	Produtividade em ácido láctico (g. L ⁻¹ . h ⁻¹) obtidas nos ensaios sem e com adição de mel (3 e 5%) fermentadas pelos micro-organismos probióticos <i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> e a mistura das duas cepas.....	93
Tabela 13	Potencial hidrogeniônico (pH) inicial e acidez produzida (% de ácido láctico) durante o processo fermentativo nas bebidas à base de EHS adicionadas de mel de abelha nas concentrações de 0, 3 e 5%.....	94
Tabela 14	Contagens por grupo de micro-organismos probióticos após fermentação nas bebidas adicionadas (3 e 5%) ou não de mel de abelha.....	96
Tabela 15	Análises microbiológicas das bebidas fermentadas à base EHS adicionadas de mel de abelha antes da fermentação.....	100
Tabela 16	Análises microbiológicas das bebidas fermentadas à base EHS adicionadas de mel de abelha depois da fermentação.....	100
Tabela 17	Caracterização sócio-econômica dos participantes dos testes de aceitação e intenção de compra de bebidas fermentadas à base de EHS.....	101
Tabela 18	Média das notas de aceitação da 1 ^a sessão em relação à aparência, aroma, sabor, consistência, impressão global e das notas de intenção de compra das amostras de bebidas à base de soja adicionadas de mel após o processo fermentativo pelo <i>L.acidophilus</i>	106
Tabela 19	Média das notas de aceitação da 2 ^a sessão em relação à aparência, aroma, sabor, consistência, impressão global e das notas de intenção de compra das amostras de bebidas à base de soja adicionadas de mel após o processo fermentativo pelo <i>L.casei</i>	111
Tabela 20	Média das notas de aceitação da 3 ^a sessão em relação à aparência, aroma, sabor, consistência, impressão global e das notas de intenção de compra das amostras de bebidas à base de soja adicionadas de mel após o processo fermentativo pelo <i>L.acidophilus</i> e <i>L.casei</i>	117

Tabela 21	Determinação do pH e acidez total das bebidas fermentadas pelo <i>L.acidophilus</i> durante a vida de prateleira.....	126
Tabela 22	Determinação do pH e acidez total das bebidas fermentadas pelo <i>L.casei</i> durante a vida de prateleira.....	126
Tabela 23	Determinação do pH e acidez total das bebidas fermentadas pela mistura do <i>L.acidophilus</i> com <i>L.casei</i> durante a vida de prateleira...	127
Tabela 24	Contagem microbiana das bebidas fermentadas pelo <i>L.acidophilus</i> durante a vida de prateleira.....	130
Tabela 25	Contagem microbiana das bebidas fermentadas pelo <i>L.casei</i> durante a vida de prateleira.....	130
Tabela 26	Contagem microbiana das bebidas fermentadas pela mistura do <i>L.acidophilus</i> com <i>L.casei</i> durante a vida de prateleira.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma da metodologia de produção de bebidas fermentadas à base de EHS.....	62
Figura 2	Fluxograma da produção das bebidas fermentadas à base de EHS.....	68
Figura 3	Fotografias da realização da análise sensorial (A e B).....	71
Figura 4	Fotografias das bebidas armazenadas na BOD durante os testes de vida de prateleira (figuras A, B e C).....	74
Figura 5	Fotografias das placas de contagem (A e B) e de isolamento/purificação (C) do <i>L. acidophilus</i> em meio MRS. (A) <i>L.acidophilus</i> na diluição 10^{-5} , (B) <i>L.acidophilus</i> na diluição 10^{-6} , (C) Isolamento e purificação de <i>L.acidophilus</i>	82
Figura 6	Fotografias das placas de contagem (A e B) e de isolamento/purificação (C) do <i>L. casei</i> em meio MRS. (A) <i>L.casei</i> na diluição 10^{-5} , (B) <i>L.casei</i> na diluição 10^{-6} , (C) Isolamento e purificação de <i>L.casei</i>	83
Figura 7	Fotografias das placas de contagem (A e B) das bebidas inoculadas com <i>L. casei</i> e <i>L.acidophilus</i> em meio MRS. (A) <i>L.casei</i> e <i>L.acidophilus</i> na diluição 10^{-5} , (B) <i>L.casei</i> e <i>L.acidophilus</i> na diluição 10^{-6}	83
Figura 8	Variação do pH e da acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS inoculado com 2% m/v de <i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> e a mistura das linhagens.....	86
Figura 9	Variação do pH e acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS sem (0% mel) e com adição de 3 e 5% de mel antes e inoculado com <i>L.acidophilus</i> (2%).....	90
Figura 10	Variação do pH e acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS sem (0% mel) e com adição de 3 e 5% de mel antes e inoculado com <i>L.casei</i> (2%).....	91

Figura 11	Variação do pH e acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS sem (0% mel) e com adição de 3 e 5% de mel antes e inoculado pela mistura do <i>L.acidophilus</i> (1%) e <i>L.casei</i> (1%).....	92
Figura 12	Percentual (%) de consumidores que disseram já ter ou não experimentado bebidas à base de soja anteriormente ao teste de aceitação e intenção de compra.....	102
Figura 13	Percentual (%) de consumidores que relataram o quanto gostam ou desgostam de bebidas à base de soja.....	102
Figura 14	Frequência de consumo (%) de bebidas à base de soja pelos consumidores.....	103
Figura 15	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (<i>L.acidophilus</i>) em relação à característica sensorial “aparência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	107
Figura 16	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (<i>L.acidophilus</i>) em relação à característica sensorial “aroma” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	107
Figura 17	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (<i>L.acidophilus</i>) em relação à característica sensorial “sabor” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	108
Figura 18	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (<i>L.acidophilus</i>) em relação à característica sensorial “impressão global” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	109
Figura 19	Porcentagens de intenção de compra positiva ou negativa ou atitude de indiferença pela avaliação das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (<i>L.acidophilus</i>) em relação ao teste de	

	intenção de compra das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Intenção de compra positiva: notas 4 e 5. Intenção de compra negativa: notas 1 e 2. Atitude de indiferença: nota 3.....	109
Figura 20	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (<i>L.acidophilus</i>) em relação à característica sensorial “consistência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	111
Figura 21	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (<i>L.casei</i>) em relação à característica sensorial “aparência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	113
Figura 22	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (<i>L.casei</i>) em relação à característica sensorial “aroma” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	114
Figura 23	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (<i>L.casei</i>) em relação à característica sensorial “sabor” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	115
Figura 24	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (<i>L.casei</i>) em relação à característica sensorial “impressão global” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	116
Figura 25	Porcentagens de intenção de compra positiva ou negativa ou atitude de indiferença pela avaliação das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (<i>L.casei</i>) em relação ao teste de intenção de compra das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Intenção de compra positiva: notas 4 e 5. Intenção de compra negativa: notas 1 e 2. Atitude de indiferença: nota 3.....	116
Figura 26	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (<i>L.casei</i>) em relação à característica sensorial “consistência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.....	117
Figura 27	Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos <i>L.acidophilus</i> com	

- L.casei*) em relação à característica sensorial “aparência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50..... 119
- Figura 28 Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “aroma” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50..... 119
- Figura 29 Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “consistência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50..... 120
- Figura 30 Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “sabor” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50..... 121
- Figura 31 Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “impressão global” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50..... 122
- Figura 32 Porcentagens de intenção de compra positiva ou negativa ou atitude de indiferença pela avaliação das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação ao teste de intenção de compra das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Intenção de compra positiva: notas 4 e 5. Intenção de compra negativa: notas 1 e 2. Atitude de indiferença: nota 3..... 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA -	Análise de Variância
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC -	Association of Official Analytical Chemists
APHA -	American Public Health Association
ATT -	Acidez total titulável
B. –	<i>Bifidobacterium</i>
BOD -	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<i>C.botulinum</i> -	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>E.coli</i> -	<i>Escherichia coli</i>
EHS -	Extrato Hidrossolúvel de Soja
EMBRAPA -	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et al. -	Entre outros autores
FAFAR/UFMG -	Faculdade de Farmácia da UFMG
FAO -	Food and Agriculture Organization of United Nations
FDA -	Food and Drug Administration
FOS -	Frutooligossacarídeo
FOSHU -	Foods for Specified Health Use
h -	Horas
IDR -	Instituto Danone Research
ISO -	International Organization for Standardization
ITAL -	Instituto de Tecnologia de Alimentos
L. -	<i>Lactobacillus</i>

LASEC -	Laboratório de Análise Sensorial e Estudos de Consumidor
m/v -	Massa por volume
MAPA -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL -	Mililitro
MRS -	Meio de cultura agar De Man, Rogosa and Sharpe
MS -	Ministério da Saúde
n -	Número amostral
NMP -	Número mais provável
°D -	Graus Dornic
EMF -	Via de Embden-Meyerhof-Parnas
p/v -	Parte por volume
pH -	Potencial hidrogeniônico
Redox -	Potencial de óxido-redução
sp -	Espécie
TGI -	Trato gastrointestinal
UFC -	Unidade formadora de colônia
UFMG -	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO -	World Health Organization

RESUMO

A soja e seus derivados vêm apresentando grande relevância no mercado, pois o grão é considerado fonte de diversos nutrientes e, ainda, compostos responsáveis por proporcionar benefícios à saúde. Entretanto, possuem baixa aceitação devido ao aroma e sabor considerados desagradáveis. A fim de superar essas limitações, a fermentação tem sido utilizada no desenvolvimento de alimentos derivados da soja, pois produzem substâncias que mascaram o sabor destes produtos, melhorando sua aceitação. O extrato hidrossolúvel de soja (EHS) vem sendo bastante empregado como matéria prima para a produção de bebidas fermentadas por se tratar de um alimento rico em nutrientes que estimulam o crescimento de micro-organismos. Assim, o desenvolvimento de bebidas fermentadas utilizando EHS, com culturas probióticas e acrescidas de prebióticos, torna-se opção interessante para consumidores que buscam alimentos saudáveis e nutritivos. Este trabalho objetivou desenvolver bebidas fermentadas à base de EHS, utilizando-se duas linhagens probióticas para a fermentação (*L.casei* e *L.acidophilus*) acrescidas de mel de abelha nas concentrações de 3 e 5% m/v. Foram realizados testes com a adição de mel ao EHS antes da fermentação com o objetivo de verificar se o mesmo exercia efeito prebiótico aos micro-organismos. Outros testes foram realizados adicionando-se o mel após a fermentação do EHS com o intuito de proporcionar um sabor mais agradável nas bebidas e de verificar se o mesmo contribuía para a manutenção da viabilidade das linhagens probióticas durante a vida de prateleira. As fermentações foram acompanhadas pela medida do pH e acidez total expressa em ácido láctico e foi determinada também a contagem de células viáveis no final da fermentação. A adição de 3 e 5% de mel ao EHS ocasionou redução no tempo de fermentação para todos os micro-organismos testados, sendo a redução de aproximadamente 60% no tempo de fermentação nas bebidas obtidas com o *L. casei* com a adição de 3 ou 5% de mel de abelha. As bebidas adicionadas de mel e seus respectivos controles foram analisadas sensorialmente sendo que as mais aceitas foram as adicionadas de 5% de mel. O estudo da vida de prateleira foi feito com as bebidas mais aceitas na análise sensorial e com a bebida controle (sem adição de mel). Estas bebidas foram mantidas a 4° C durante 28 dias e foram determinados a acidez total, o pH e contagem de células viáveis no 1°, 7°, 14° e 28° dia. As linhagens de *L.casei* e a

cultura mista de *L.casei* e *L.acidophilus* permaneceram viáveis nas bebidas durante os 28 dias de armazenamento, com contagens maiores do que os valores mínimos exigidos pela legislação brasileira para serem consideradas probióticas. A linhagem de *L.acidophilus* permaneceu viável até o 21º dia de armazenamento na bebida adicionada de 5% de mel e até o 7º dia na bebida sem adição de mel, com contagens de células superiores 6 log UFC/mL. Considerando os resultados concluiu-se que as bebidas fermentadas com a cultura mista de *L.acidophilus* e *L.casei* adicionadas de 5% após a fermentação foram as que apresentaram as melhores características sensoriais e também mantiveram a contagem de células viáveis maior que o valor exigido pela legislação brasileira para ser considerada probiótica.

Palavras-chave: soja; extrato hidrossolúvel de soja; probióticos; prebióticos; mel de abelha; bebidas fermentadas.

ABSTRACT

Soy and its derivatives have shown great relevance in the market, because the grain is considered a source of many nutrients and also compounds responsible for providing health benefits. However, they have low acceptance due to the aroma and taste considered disagreeable. To overcome these limitations, the fermentation has been used in the development of soy foods, they produce substances that mask the taste of these products, improving their acceptance. The water extract of soybean (EHS) has been widely used as raw material for the production of fermented milk because it is a food rich in nutrients that stimulate the growth of micro-organisms. Thus, the development of fermented beverages using EHS with probiotic cultures and prebiotic plus, it becomes interesting option for consumers looking for healthy and nutritious food. This study aimed to develop fermented beverages based EHS, using two probiotic strains for fermentation (*L.casei* and *L. acidophilus*) plus honey at concentrations of 3 and 5% w/v. Tests were performed by adding honey before fermentation in order to act as a possible prebiotic to probiotic micro-organisms and after the fermentation process in order to provide a more pleasant taste in beverages and a possible maintenance of counts of probiotic strains during shelf life. After preparation of the drinks were also studied: fermentation kinetics beverages by measuring the pH and acidity in lactic acid, the viability of probiotic strains after preparation thereof; acceptance and purchase intent drinks tasters, and life shelf of sensorially acceptable which were more for 28 days under refrigeration by determining the viability of the probiotic micro-organisms and measurement of pH and acidity. It was found that the mixture of strains was the best inoculum for the development of drinks, since the fermentation process conducted quickly; showed good cell growth with sufficient counts for probiotic drinks are considered according to the legislation and, furthermore, their drinks kept the viable counts during the 28 days of storage at 4 ° C. It was also found that the addition of honey at a concentration of 5% better results than the concentration of 3% as reduced fermentation time optimizing fermentation process in all drinks, independent of the strain used; drinks added 5 % honey showed the lowest rejection rate in sensory analysis, and, finally, the drinks added 5% honey and fermented by the mixture of cultures and the *L.casei*, were the ones that showed non-significant decrease of the

count probiotic microorganisms during the storage period, indicating that the honey this concentration may have affected the maintenance count the initial level of these crops. Thus, it is concluded that the fermented beverage by mixing the added strains of 5% honey after fermentation was chosen as the one that achieved the goal of this study.

Keywords: soybean; soybean water extract; probiotics; prebiotics; honey; fermented beverages.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com relação à alimentação vem aumentando muito nas últimas décadas. A nutrição continua desempenhando o seu papel de fornecer nutrientes através dos alimentos, mas o conceito de alimentos funcionais faz com que essa ciência se associe à medicina e ganhe dimensão extra no século XXI (SALGADO, 2001). Estes são definidos, de acordo com a European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (1999), como “alimentos para os quais pode ser satisfatoriamente demonstrado que eles afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, além de garantirem efeitos nutricionais adequados, conduzindo a uma melhoria do estado geral de saúde e bem estar e/ou a uma redução do risco de doenças”.

Já de acordo com Gomes (2009), os alimentos funcionais são definidos como alimentos semelhantes em aparência ao alimento convencional, consumidos como parte da dieta usual, capazes de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônicas degenerativas, além de manter suas funções nutricionais básicas. Porém, deve-se salientar que esses alimentos possuem efeito na promoção da saúde, não na cura de doenças (SANDERS, 1998).

Não há definição de alimentos funcionais pela legislação brasileira. Ela define a alegação de propriedade funcional e a alegação de propriedade de saúde, ambas descritas no “Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas nos rótulos dos alimentos” (ANVISA, 1999a). Dentre os potentes alimentos funcionais, destacam-se a soja, os probióticos e os prebióticos.

A soja e seus derivados vêm apresentando grande relevância no mercado, pois o grão é considerado fonte de proteínas, minerais, vitaminas do complexo B, fibras e isoflavonas, grupo de compostos fenólicos responsáveis por proporcionar benefícios à saúde (SILVA et al., 2009). Além disso, principalmente devido à quantidade e qualidade de sua proteína, a soja é considerada, dentre os vegetais, o melhor alimento substituto dos produtos de origem animal (DE ANGELIS, 1999).

Apesar dos benefícios atribuídos ao consumo do grão de soja, este possui baixa aceitação entre os brasileiros, devido principalmente ao aroma e ao sabor considerados desagradáveis. Enzimas lipoxigenases presentes nos grãos atuam sobre ácidos graxos poliinsaturados contidos na leguminosa, conferindo à soja e seus derivados sabor semelhante a ranço, causando rejeição pelos consumidores (BEHRENS & SILVA, 2004). Outro fator que contribui para o baixo consumo da soja são os oligossacarídeos encontrados na leguminosa e seus derivados, responsáveis por desconfortos abdominais e flatulência. Entretanto, esses efeitos anti nutricionais podem ser reduzidos submetendo o grão a processos fermentativos, apresentando em seus produtos finais redução dos oligossacarídeos em açúcares simples (CRUZ et al., 2009; MARAZZA et al., 2009; ROSA et al., 2009).

A fermentação tem sido muito utilizada no desenvolvimento de produtos derivados da soja a fim de superar limitações como odores e sabores desagradáveis. Para isso, o extrato hidrossolúvel de soja – EHS - está sendo extensivamente empregado como meio de crescimento de bactérias lácticas e culturas probióticas, na produção de queijos e leites fermentados, por se tratar de um alimento rico em nutrientes que estimulam o crescimento de tais micro-organismos. Segundo Shimakawa et al. (2003), o EHS é um excelente veículo para bifidobactérias, já que sua proteína protege os micro-organismos da ação de sais biliares, favorecendo a colonização intestinal. Além disso, para muitas pessoas, o EHS é utilizado como substituto do leite de vaca devido à intolerância e à alergia das mesmas em relação ao açúcar e às proteínas presentes no leite bovino, respectivamente.

A substituição do leite de vaca pelo EHS seria perfeita nutricionalmente, em relação às proteínas e outros nutrientes. Porém ao se considerar os micronutrientes como, por exemplo, o cálcio, o alimento não se torna adequado substituto do leite bovino (HEANEY et al., 2000) por conter apenas 4 mg/100 mL de cálcio (PHILIPPI, 2002) sendo que o mesmo é imprescindível, principalmente, para a saúde dos ossos.

Além dos produtos derivados da soja, os alimentos simbióticos são potentes alimentos funcionais e estão em ascensão na indústria alimentícia devido aos inúmeros benefícios que causam à saúde de seus consumidores. Esses alimentos proporcionam a ação conjunta de prebióticos e probióticos, sendo classificados como componentes dietéticos funcionais que podem aumentar a

sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato digestivo superior, pois seu substrato específico – prebiótico - está disponível para fermentação (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

O termo probiótico proposto por Fuller (1989) foi redefinido por uma comissão especializada conjunta, a Organização Mundial de Saúde (OMS), como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Para receberem a nomenclatura de “alimentos probióticos”, esses produtos devem conter, no mínimo, 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de microrganismos viáveis na porção diária do produto (ANVISA, 2008).

Já os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis, com atividade bifidogênica, ou seja, capazes de estimular o crescimento e/ou atividade de algumas bactérias presentes no intestino (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Dentre os principais prebióticos que têm recebido maior atenção, destacam-se a inulina e os oligossacarídeos, especialmente os frutooligossacarídeos (FOS). Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel (LEITE et al., 2000).

Segundo Anjo (2004), o mel é um alimento funcional que exerce atividade prebiótica e tem como efeito a regulação do trânsito intestinal, regulação da pressão arterial, redução do risco de câncer e dos níveis de colesterol.

Neste contexto, o desenvolvimento de bebidas fermentadas à base de EHS, com culturas probióticas e acrescidas de prebióticos, torna-se opção interessante para consumidores que buscam alimentos saudáveis e nutritivos.

Assim, este trabalho teve como objetivo principal desenvolver bebidas fermentadas à base de EHS, utilizando-se duas linhagens probióticas para a fermentação (*L.casei* e *L.acidophilus*), acrescidas de mel de abelha. E como objetivos específicos:

1. Determinar a cinética da fermentação láctica na produção das bebidas pela medida do pH e acidez em ácido láctico;
2. Determinar a viabilidade das linhagens probióticas após o preparo das bebidas;

3. Realizar análises microbiológicas das bebidas a serem submetidas à análise sensorial e verificar se estão de acordo com a legislação correspondente;
4. Avaliar a aceitação e intenção de compra das bebidas pelos consumidores;
5. Avaliar a vida de prateleira das bebidas que foram mais aceitas sensorialmente através da determinação da viabilidade dos micro-organismos probióticos e medição do pH e acidez.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Devido às mudanças ocorridas no estilo de vida após a industrialização, houve um aumento na incidência de doenças devido à má alimentação e ao excesso de trabalho com sintomas como cansaço, irritação, depressão, estresse, dentre outros (KWAK & JUKES, 2001). Apesar disto, a baixa ocorrência desses sintomas e de doenças em alguns povos chamou a atenção para as suas dietas. Os franceses, devido ao consumo diário de vinho tinto, bebida rica em compostos fenólicos, têm baixo índice de problemas cardíacos. O mesmo ocorre com os esquimós, com sua alimentação rica em ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e 6 advindos do alto consumo de peixes e produtos do mar. Já os orientais, devido à grande ingestão de soja e seus subprodutos, apresentam baixa incidência de câncer de mama. Além disso, nestes países, o costume de consumir frutas e verduras também resulta numa redução do risco de doenças coronarianas e de câncer, comprovada por dados epidemiológicos (ANJO, 2004).

Dessa forma, atualmente os alimentos não estão sendo mais vistos apenas como uma forma de suprir o organismo de nutrientes necessários para o seu bom funcionamento ou como meio de saciar a fome. São vistos também como importante fonte de prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis devido à eficácia de alguns de seus componentes em promover a saúde (LEITE & ROSA, 2008). Os alimentos que contêm essas propriedades são conhecidos como “alimentos funcionais” e estão em ascensão nas últimas décadas, devido

principalmente, à crescente busca pela população por uma alimentação mais saudável e melhora na qualidade de vida.

Os alimentos funcionais, de acordo com Gomes (2009), são definidos como alimentos semelhantes em aparência ao alimento convencional, consumidos como parte da dieta usual, capazes de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônicas degenerativas, além de manter suas funções nutricionais básicas.

Não há definição de alimentos funcionais pela legislação brasileira. Ela define a alegação de propriedade funcional e a alegação de propriedade de saúde, ambas descritas no “Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas nos rótulos dos alimentos”. Os alimentos com alegação de propriedade funcional se referem àqueles que apresentam papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não-nutriente tem no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais no organismo humano, devendo ser seguros para o consumo sem necessidade de supervisão médica. Já os alimentos com alegação de propriedade de saúde se referem àqueles que possuem relação positiva com doença ou condição relacionada à saúde (ANVISA, 1999a). Porém, até hoje nenhum alimento foi aprovado apresentando alegação de saúde.

2.1.1 Histórico e legislações

A classe de alimentos funcionais, aparentemente nova e moderna, já existe há milhares de anos. Hipócrates, há 2500 anos declarou “*faça do seu alimento o seu medicamento*”, se referindo à idéia de que os alimentos poderiam ser utilizados para prevenir e tratar doenças, pois desde esta época componentes como cascas, folhas, raízes e flores eram utilizados para tratar enfermidades específicas. Desta forma, os alimentos funcionais estão presentes em nossa história desde muito tempo, porém, apenas há alguns anos atrás foram reconhecidos e conceituados (EVANGELISTA, 2005).

O Japão foi o pioneiro a introduzir o conceito de alimentos funcionais na sua legislação em meados da década de 80. Devido à alta expectativa de vida no país e, conseqüentemente, ao predomínio da população idosa, o governo japonês

esforçou-se em desenvolver alimentos mais saudáveis e que reduzissem o risco de doenças crônicas não transmissíveis, com o objetivo de minimizar os gastos com a saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a). Denominados de FOSHU em 1991, “Foods for Specified Health Use” ou “Alimentos para Uso Específico de Saúde”, eles trazem um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem-Estar japonês (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005b) e já somam em mais de 100 produtos diferentes (ARRABI, 2001).

Com a tomada à frente do Japão na regulamentação dos alimentos funcionais, o “novo” conceito foi rapidamente adotado em todo o mundo. No entanto, as denominações das alegações e os critérios para a sua utilização nos alimentos, variam de acordo com a legislação de cada país. Entre as legislações de alimentos funcionais, a do Japão e a da Europa estão mais avançadas do que a dos Estados Unidos, a FDA – Food and Drug Administration. A japonesa possui 12 classes de compostos já aprovados como fibras, polióis, peptídeos, proteínas, glicosídeos, álcoois, fenóis, isoprenóides, vitaminas, colina, minerais e outros, como as bactérias do ácido láctico. A americana relaciona em suas alegações, saúde e dieta nos seguintes aspectos: cálcio e osteoporose; gorduras e câncer; gorduras saturadas e/ou colesterol e doenças cardíacas; frutas, verduras, grãos e câncer ou coronariopatias; ácido fólico e alteração de tubo neural; e, enfim, sódio e hipertensão. A FDA não liberou as declarações referentes aos ácidos graxos ômega 3 e às vitaminas antioxidantes, por verificar que não existem evidências científicas suficientes para suas aprovações. Dessa forma, essas alegações encontram-se proibidas (CÂNDIDO & CAMPOS, 1995).

No Brasil, foi a partir dos anos 90 – após o pioneirismo do Japão no assunto - que os alimentos passaram a ser vistos como sinônimos de bem-estar e veículos de uma melhor qualidade de vida, através da redução dos riscos de doenças. Desta forma, no ano de 1999, o Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os alimentos funcionais por meio das resoluções ANVISA/MS nº 16/99, ANVISA/MS nº 17/99, ANVISA/MS nº 18/99 e ANVISA/MS nº 19/99. Essas resoluções tratam, respectivamente, dos procedimentos para registro de alimentos e/ou novos ingredientes (ANVISA, 1999b), das diretrizes básicas para avaliação do risco e segurança dos alimentos (ANVISA, 1999c), das diretrizes básicas para análise e comprovação de alegação de propriedade funcional e/ou de saúde presentes em rotulagem de alimentos

(ANVISA, 1999a), e ainda, dos procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde (ANVISA, 1999d).

2.1.2 Substâncias com alegações aprovadas

De acordo com os dados revisados e atualizados pela ANVISA em julho de 2008, 19 substâncias e 10 micro-organismos são responsáveis pelas 10 alegações de propriedades funcionais aprovadas no Brasil (ANVISA, 2008). São elas:

- Beta-glucana e fitoesteróis: redução da absorção de colesterol;
- Quitosana: redução da absorção de gordura e colesterol;
- Psyllium: redução da absorção de gordura;
- Ômega 3: auxilia na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos;
- Proteína de soja: auxilia na redução do colesterol;
- Frutooligossacarídeos e inulina: contribuem para o equilíbrio da flora intestinal
- Dextrina resistente, goma guar parcialmente hidrolisada, polidextrose e lactulose: são fibras alimentares que auxiliam o funcionamento intestinal;
- Licopeno, luteína e zeaxantina: possuem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres;
- Manitol, xilitol e sorbitol: não produzem ácidos que danificam os dentes;
- Probióticos: contribuem para o equilíbrio intestinal.

Dentre os micro-organismos probióticos aprovados encontram-se: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

É importante lembrar que, o fato das substâncias fisiologicamente ativas estarem presentes nos alimentos não é suficiente para que os mesmos sejam considerados funcionais. Esses compostos com propriedades funcionais devem estar presentes em quantidades suficientes e adequadas para produzir o efeito fisiológico esperado. Outra consideração é que a alimentação saudável como medida de promoção da saúde não pode ser dissociada da adoção de hábitos de

vida saudáveis, especialmente a prática de atividade física. Assim, todas as alegações da ANVISA vêm acompanhadas dos seguintes dizeres: “Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2008).

2.1.3 Características dos alimentos funcionais

Para serem considerados funcionais, os alimentos devem apresentar as seguintes características (ROBERFROID, 2000): ser alimentos convencionais, sendo consumidos na dieta usual das pessoas; ser compostos por componentes naturais, às vezes, em elevadas concentrações, ou estarem presentes em alimentos que normalmente não os supririam; ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, aumentando o bem estar e a saúde dos seus consumidores e diminuindo o risco de ocorrência de doenças; possuir alegações de propriedade funcional com embasamentos científicos; podem ser alimentos naturais ou alimentos nos quais um componente tenha sido retirado; e, pode ser ainda, alimentos nos quais a natureza ou a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada.

2.2 TRATO GASTROINTESTINAL E SUA MICROBIOTA

O trato gastrointestinal constitui um complexo ecossistema de micro-organismos (FOOKS et al., 1999). É responsável por duas funções principais que são garantir a absorção dos nutrientes e proporcionar uma barreira seletiva física, microbiológica e imunológica contra agentes potencialmente prejudiciais ao organismo (INSTITUTO DANONE RESEARCH, 2007).

No intestino delgado, ocorre a digestão enzimática dos alimentos e a absorção dos nutrientes. Já o cólon é o local responsável por absorver grande quantidade de água e eletrólitos, permitir a evacuação de resíduos e substâncias tóxicas, e ainda, alojar várias espécies de bactérias que irão metabolizar os substratos que não foram digeridos pelo intestino delgado. A degradação desses compostos resulta na formação de ácidos graxos de cadeia curta e estes, servem de substrato para as células epiteliais do cólon (MACFARLANE, 1997).

Mais de 400 espécies de bactérias habitam o cólon, em número aproximadamente 10 vezes maior do que o de células do corpo. A maioria delas é benéfica ao hospedeiro, porém, algumas são potencialmente patogênicas, mas por estarem presentes em pequenas quantidades, normalmente não constituem ameaça ao organismo (HOVERSTAD, 1988).

Logo após o nascimento, o trato gastrointestinal – TGI - dos seres humanos até então estéril, é colonizado por população microbiana materna e ambiental (BARBOSA et al., 2006), onde a maioria da microbiota intestinal saudável advém da mãe. Assim, fatores como dieta, ambiente e estresse vão influenciar a composição da flora da mãe e, conseqüentemente, a da criança ao nascer. Portanto, o desenvolvimento da microbiota do recém-nascido é fortemente dependente das práticas de alimentação maternas e da higiene do ambiente (SALMINEN & ISOLAURI, 2006). Depois de um a dois anos, após ser colonizado, o trato gastrointestinal passa a abrigar uma população microbiana bastante densa e variável (NICOLI, 1995).

O crescimento de micro-organismos em determinada área do trato gastrointestinal depende de fatores fisiológicos, como temperatura, umidade, pH e presença de certos nutrientes e substâncias inibitórias (HOLZAPFEL et al., 1998). Dessa forma, a composição microbiana do TGI é a seguinte: no estômago, poucas colônias são encontradas em razão da presença de oxigênio e do ácido clorídrico; no intestino delgado, a quantidade de bactérias inicia-se muito baixa no duodeno, mas vai aumentando até o íleo terminal; já no ceco e no cólon, o trânsito intestinal é mais lento e o ambiente possui menor teor de oxigênio e potencial hidrogeniônico (pH) menos ácido, sendo, por isso, o local onde se encontra a maior quantidade de micro-organismos (ZETTERSTROM, 1994).

Os micro-organismos estritamente anaeróbicos compõem a população dominante do TGI: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcus*. Estes quatro tipos de bactérias são encontradas em concentrações entre 8 log e 11 log UFC (unidades formadoras de colônias) de micro-organismos por grama em todos os seres humanos, sendo que os mais numerosos são os *Bacteroides*, Gram-negativos, seguidos pelas *Bifidobactérias*, Gram-positivas. São consideradas populações subdominantes as bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e encontradas em menores quantidades ainda, *Enterobacteriaceae* e o *Clostridium*,

além das leveduras, com 4 log a 8 log UFC/g (INSTITUTO DANONE RESEARCH, 2007).

De acordo com o Instituto Danone Research – IDR - (2007), a manutenção de uma microbiota intestinal estável depende de três fatores: fisiológico, iatrogênico e nutricional. Os fatores fisiológicos se referem à idade, a alterações hormonais como no período da menopausa e ao estresse; os iatrogênicos, à presença ou não de patologias e uso de medicamentos; e os fatores nutricionais, ao consumo de alimentos que contenham substâncias prebióticas ou micro-organismos probióticos.

2.3 PROBIÓTICOS

Os probióticos, durante muito tempo, foram definidos como sendo suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Além desta, diversas outras definições foram publicadas nos últimos anos (SANDERS, 2003). Entretanto, a definição atual e aceita internacionalmente é a de que eles são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Food and Agriculture Organization - FAO - & World Health Organization – WHO -, 2006).

Os relatos sobre os benefícios à saúde proporcionados pelo uso de micro-organismos vivos em alimentos são bem antigas. No Antigo Testamento dos Persas, Gênesis 18:8, está escrito “*Abraão deveria sua longevidade ao consumo de leite ácido*”. Em 76 a.C, um historiador romano já indicava o uso de leites fermentados para o tratamento de doenças gastrointestinais (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001; TEITELBAUM & WALKER, 2002).

Durante os anos de 1857 a 1863, Pasteur estudou a relação entre micro-organismos e os processos fermentativos (SILVA & STAMFORD, 2000). Tissier, microbiologista francês, em 1899, isolou a primeira bactéria bífida no Instituto Pasteur, em Paris, de uma criança ainda em fase de amamentação e a denominou de *Bacillus bifidus communis* (WGO, 2008). Na mesma época, descobriu que era saudável a presença de bifidobactérias no intestino. Ele observou que as

bifidobactérias eram dominantes nas fezes dos bebês amamentados e não dominantes nas fezes dos bebês alimentados por mamadeira. Ao mesmo tempo, verificou que os bebês amamentados eram significativamente mais resistentes a diarreia e infecções (O’SULLIVAN & KULLEN, 1998; PENNA et al., 2000). Dessa forma, concluiu que a presença desse grupo de bactérias no intestino humano é natural e benéfica ao hospedeiro.

O pesquisador russo Metchnikoff foi o pioneiro nos estudos científicos de maior importância no assunto. Em 1908, ele publicou o tratado “Prolongamento da vida” que relata a longevidade dos povos búlgaros como resultado do grande consumo de leite fermentado com *Lactobacillus*, chamados mais especificamente de *Lactobacillus bulgaricus*. Sua teoria é a de que a presença desses *Lactobacillus* no leite fermentado antagoniza os micro-organismos putrefativos, sendo estes responsáveis por produzirem substâncias tóxicas no trato intestinal, comprometendo a longevidade humana (FERREIRA, 1999; FOOKS et al., 1999).

Ainda em 1908, Metchnikoff, atuando como diretor do Instituto Pasteur, recebeu o Prêmio Nobel ao contribuir para o entendimento do sistema imunológico humano. Ele observou que os jovens possuíam maiores quantidades de bifidobactérias que os adultos, e menores quantidades de bactérias putrefativas, como os clostrídios. Verificou o inverso nos organismos adultos (O’SULLIVAN & KULLEN, 1998).

Em 1925, iniciaram-se os estudos com os *Lactobacillus*. Em 1930, foi descoberta uma cepa capaz de sobreviver à passagem pelo TGI. Identificada como *Lactobacillus casei* Shirota, ela foi isolada, cultivada e usada com sucesso na produção de um leite fermentado chamado “Yakult” (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

No final da década de 30 e durante a década de 50, diminuíram-se consideravelmente as pesquisas nesta área, provavelmente, devido aos acontecimentos que estavam ocorrendo naquele momento no mundo, como as depressões e as guerras. Porém, no final dos anos 50 e início dos anos 60, o interesse pela pesquisa da microbiota intestinal humana foi novamente despertado, dando origem, enfim, ao conceito dos “probióticos” (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

2.3.1 Principais micro-organismos utilizados como probióticos

Normalmente, os micro-organismos usados como probióticos são componentes não patogênicos da flora intestinal, como as bactérias lácticas (BARBOSA et al., 2006). Bactérias lácticas são microrganismos gram-positivos, não-esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos (HOLZAPFEL et al., 2001). O ácido láctico é o principal produto final da fermentação de açúcares (AXELSSON, 2004).

Elas são basicamente mesófilas (com algumas linhagens termófilas) sendo capazes de crescer em um intervalo de temperatura de 5 a 45°C. Além do ácido láctico produzem compostos antimicrobianos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. A produção do peróxido de hidrogênio se deve à carência da enzima catalase (FORSYTHE, 2002).

Dentre as bactérias probióticas mais utilizadas, destacam-se as cepas de lactobacilos e bifidobactérias (SHAH, 2007). Bactérias pertencentes a esses gêneros são mais frequentemente empregadas como probióticas em alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável. Porém, deve ser lembrado que cada cepa possui um efeito diferente, não podendo ser generalizada a idéia de que bactérias da mesma espécie proporcionam os mesmos benefícios ao hospedeiro (GUARNER & MALAGELADA, 2003).

A divisão dos lactobacilos está baseada em suas características fermentativas: obrigatoriamente homofermentativos, facultativamente heterofermentativos e obrigatoriamente heterofermentativos (HOLZAPFEL et al., 2001). Os lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos fermentam glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato (VÁSQUEZ et al., 2005). Exemplos desse grupo são as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus salivarius* (HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004). Os obrigatoriamente heterofermentativos fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás a partir da glicose é uma característica marcante dessas bactérias (VÁSQUEZ et al., 2005). São exemplos desse grupo as espécies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; AXELSSON, 2004). Os lactobacilos facultativamente heterofermentativos fermentam hexoses em ácido láctico e podem

produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses microrganismos também fermentam pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético. As espécies *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* e do grupo *Lactobacillus casei* são importantes representantes dos lactobacilos facultativamente heterofermentativos (AXELSSON, 2004; VÁSQUEZ et al., 2005).

Do grupo *Lactobacillus casei* fazem parte aquelas bactérias lácticas fenotipicamente e geneticamente heterogêneas que são capazes de manter o equilíbrio de vários ambientes. Nesse grupo, são destaques os lactobacilos típicos do hospedeiro humano, os quais incluem as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, além de *Lactobacillus zeae* (HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004). Essas espécies apresentam comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito similares, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes (FELIS et al., 2001; DESAI, SHAH & POWELL, 2006).

O *L. acidophilus*, cepa mais usual dos lactobacilos, é um bacilo gram-positivo com pontas arredondadas. Esta espécie é pouco tolerante à salinidade do meio e microaerófila, com o crescimento em meios de anaerobiose ou com pouco oxigênio (NAHAISI, 1986). Como micro-organismo heterofermentativo, produz quase exclusivamente ácido láctico a partir da degradação da glicose (MARSHALL & COLE, 1983).

L. acidophilus é capaz de degradar e utilizar uma variedade de carboidratos incluindo mono, di e polissacarídeos, além de carboidratos complexos como rafinose e frutooligossacarídeos. Foram identificados também sistemas de transporte para trealose, frutose, glicose, manose, melobiose, gentiobiose, celobiose, salicina, rafinose e maltose. No entanto, o *L. acidophilus* através de análise *in silico* de seu genoma parece não ter genes envolvidos no aproveitamento de sacarose (SANDERS & KLAENHAMMER, 2001; BARRANGOU et al., 2003; ALTERMANN et al., 2005; MACHADO et al., 2006).

As condições ótimas para a sua multiplicação são temperaturas de 35 - 40 °C e valores de pH de 5,5 a 6,0. Deve salientar-se que o crescimento de *L. acidophilus* pode ocorrer a 45 °C, e que a sua tolerância em termos de acidez do meio varia entre 0,3 e 1,9 % (v/v) de acidez titulável – ATT - (GOMES & MALCATA, 1999). Ainda de acordo com os mesmos autores, as condições de cultivo exigidas

por essa espécie, para um efetivo crescimento da mesma, consiste em um complexo de nutrientes como carboidratos fermentáveis; proteínas e produtos da degradação de proteínas; vitaminas do complexo B; derivados do ácido nucléico; ácidos graxos livres insaturados; e alguns minerais, como magnésio e manganês.

L. acidophilus possuem uma boa associação com *L. casei*. Quando presentes no mesmo alimento, *L. acidophilus* produz ácido butírico e láctico acidificando o meio e *L. paracasei* consomem estes metabólitos, mantendo o pH entre 6 e 7, ou seja, compatível para a sobrevivência de ambas as espécies. Já a associação de *L. acidophilus* com *L. bulgaricus* não é boa, pois as substâncias produzidas por estes últimos causam o decréscimo do primeiro. O peróxido de hidrogênio é a substância responsável por este antagonismo, mas a super acidificação causada pelos *L. bulgaricus* durante o armazenamento também afeta a viabilidade dos *L. acidophilus* (GUILLILAN & SPECK, 1977).

2.3.2 Principais critérios para seleção de probióticos

Para que uma cepa seja considerada probiótica, ela deve possuir certas características que são exigências para sua denominação como tal. O micro-organismo deve ser de origem humana, apresentar estabilidade frente ao ácido e à bile, ser capaz de aderir bem à mucosa intestinal a fim de colonizá-la, ser capaz de produzir compostos antimicrobianos, ser metabolicamente ativo, ser seguro para o uso em humanos, possuir histórico de não patogenicidade, não estar associado a outras doenças e, ainda, não ser capaz de transportar genes transmissores de resistência a antibióticos (COLLINS, THORNTON & SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000; STANTON et al., 2003). Além disso, as cepas probióticas devem também, obrigatoriamente, produzir benefícios à saúde do hospedeiro, sendo estes evidenciados cientificamente através de estudos com o organismo no qual elas irão atuar (FAO & WHO, 2001; SANDERS, 2003).

2.3.3 Efeitos benéficos à saúde e recomendação de ingestão de probióticos

Diversos são os benefícios à saúde proporcionados pelos micro-organismos probióticos: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à

colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de algumas vitaminas. Embora ainda não evidenciados cientificamente, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a redução do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular, a redução das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais e efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (SHAH & LANKAPUTHRA, 1997; CHARTERIS et al., 1998; JELEN & LUTZ, 1998; KLAENHAMMER, 2001; KAUR, CHOPRA & SAINI, 2002; TUOHY et al., 2003).

Dessa forma, os probióticos estão sendo amplamente usados nas práticas clínicas como tratamentos de cáries dentárias, dermatites atópicas, asma, infecções respiratórias, doença intestinal inflamatória, intolerância à lactose, síndrome do intestino irritável, infecção por *H. pylori*, diarreia, câncer de cólon, infecções vaginal, dentre outros, mesmo sem ainda existirem evidências científicas suficientes dos efeitos benéficos para essas situações clínicas (CARPUSO et al., 2008; DOUGLAS & SANDERS, 2008).

Entretanto, apesar dos inúmeros benefícios comprovados do uso dos probióticos e, mesmo os que ainda se encontram em estudo, salienta-se que essas vantagens à saúde são específicas de cada cepa probiótica. Assim, não há uma cepa universal que promova todos os benefícios propostos e nem se pode generalizar que cepas da mesma espécie promovem os mesmos benefícios (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Além disso, em muitos casos, há um desconhecimento da dose apropriada a ser utilizada, do tempo necessário para finalizar com êxito a terapia, da interação dos probióticos com os alimentos no intestino e da interação entre os micro-organismos probióticos quando usados em conjunto (CARPUSO et al., 2008), o que dificulta a utilização com eficácia desses micro-organismos.

Para produzir suas ações benéficas, os alimentos probióticos devem ser consumidos diariamente. A recomendação atual, de acordo com a ANVISA (2008), é baseada na ingestão diária de 8 log a 9 log UFC/dia de micro-organismos viáveis.

Essa grande quantidade é proposital e tem como objetivo compensar a possibilidade de redução da concentração dos probióticos durante o processamento, estocagem e, ainda, durante a passagem pelo TGI (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Dessa forma, a ingestão diária de probióticos é imprescindível para manter os níveis elevados dos micro-organismos, garantindo um contínuo efeito benéfico ao hospedeiro (KOMATSU et al., 2008).

2.3.4 Mecanismo de ação dos probióticos

Os modos de ação para explicar os efeitos benéficos dos probióticos no organismo, ainda não estão completamente elucidados. Porém, existem vários estudos sugerindo como ocorrem esses processos (COPPOLA & TURNERS, 2004). Esses mecanismos são, basicamente, os mesmos atribuídos à microbiota digestiva normal em perfeito funcionamento, dentre eles, proteção ecológica, imunomodulação e contribuição nutricional ao hospedeiro (NICOLI & VIEIRA, 2003).

Três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos são:

1. Modulação da microbiota intestinal através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e competição por sítios de adesão com o micro-organismo patogênico (FULLER, 1989). Essas substâncias antimicrobianas produzidas, como os ácidos orgânicos e as bacteriocinas, inibem o crescimento de vários micro-organismos patogênicos (FOOKS & GIBSON, 2002; RASTALL et al., 2005; SAAD, 2006). Já essas competições, consistem em uma exclusão competitiva, em que o probiótico compete com os patógenos por sítios de ligação e por nutrientes, impedindo a sua fixação e o seu desenvolvimento no hospedeiro (COPPOLA & TURNES, 2004; RASTALL et al., 2005; SNELLING, 2005).
2. Alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática (FULLER, 1989). As bactérias lácticas produzem a enzima β -D galactosidase auxiliando a quebra da lactose no intestino. Essa ação é fundamental, particularmente no caso de indivíduos com intolerância à lactose, que são incapazes de digeri-la adequadamente, o que resulta em desconforto abdominal (LOURES-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

3. Estímulo à imunidade do hospedeiro através do aumento dos níveis de anticorpos no organismo e da atividade dos macrófagos (FULLER, 1989). Os probióticos aumentam os níveis de citocinas, ativam macrófagos, aumentam a atividade das células destruidoras naturais (“natural killer”) e, também, os níveis de imunoglobulinas (SAAD, 2006).

2.4 PREBIÓTICOS

Algumas cepas probióticas, como as bifidobactérias, por serem anaeróbias e não tolerarem bem o ambiente ácido apresentam dificuldade de manipulação e, conseqüentemente, da sua utilização em produtos alimentícios. Assim, o emprego de prebióticos se tornou uma alternativa atraente para auxiliar o aumento dessas cepas no TGI (CHOU & HOU, 2000). Seletivamente, os prebióticos aumentam o crescimento das bactérias benéficas no cólon, em detrimento às bactérias patogênicas promovendo o equilíbrio intestinal do hospedeiro. Dessa forma, estão sendo desenvolvidos a todo tempo produtos como suplementos alimentares, produtos lácteos, pães e bebidas adicionados de prebióticos (WILLIAMSON, 2009).

O termo “prebiótico” foi originado com a definição de “ingrediente alimentar não digerível, que atua estimulando seletivamente o crescimento ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon, podendo melhorar a saúde do hospedeiro” (GIBSON & ROBERFROID, 1995; KNORR, 1998; FOOKS et al., 1999). Entretanto, uma definição mais recente foi publicada no relatório do Encontro Técnico da FAO sobre Prebióticos, em 2007: “um prebiótico é um componente alimentar não viável que confere benefícios à saúde do hospedeiro associado com a modulação da sua microbiota” (PINEIRO et al., 2008).

Outras definições mais abrangentes foram sendo desenvolvidas como a de que os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, podendo ainda, inibir a multiplicação de patógenos garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (GIBSON & ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2001; GILLILAND, 2001; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Os ingredientes alimentares que mais atendem

a esses requerimentos, até o presente momento, são os oligossacarídeos (GIBSON, 1994; PINHEIRO, 2002) como os FOS e a inulina. Alguns alimentos possuem naturalmente substâncias prebióticas como alho-poró, almeirão, aspargo, banana, alcachofra, alho, cebola, soja, trigo e aveia (WILLIANSOM, 2009).

2.4.1 Mecanismo de ação dos prebióticos

Os prebióticos e probióticos possuem mecanismos de ação em comum, especialmente quanto à modulação da microbiota intestinal. Os prebióticos, como são carboidratos não digeríveis, são resistentes à digestão na parte superior do trato gastrointestinal (ROBERFROID, 2002) chegando intactos ao intestino delgado. Porém, durante a sua passagem, enquanto ainda não são fermentados, eles vão exercendo um efeito osmótico no TGI, que pode resultar em diarreia em alguns organismos, se estiverem presentes em altas quantidades (MARTEAU & BOUTRON-RUAULT, 2002). Quando atingirem o intestino grosso, local em que exercerão o efeito prebiótico, eles servirão de substrato para as bactérias anaeróbias intestinais que irão fermentá-los estimulando o crescimento das mesmas no cólon e produzindo gases, os ácidos graxos de cadeia curta e o ácido láctico. Conseqüentemente haverá uma diminuição do pH do lúmen e estimulação da proliferação de células epiteliais do cólon (CARABIN & FLAMM, 1999).

2.4.2 Efeitos benéficos à saúde e recomendação de ingestão

O principal efeito benéfico atribuído ao consumo de prebióticos é a mudança positiva na composição da microbiota intestinal (ROBERFROID, 2002). Porém, essa modulação ocorre, principalmente, devido ao aumento do número de bactérias benéficas intestinais, por os prebióticos servirem de substrato para a sua multiplicação. Assim, os seus benefícios são os mesmos relacionados à presença das bifidobactérias no hospedeiro, tais como: equilíbrio da microbiota intestinal, diminuição da colonização por patógenos, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, dentre outros já falados anteriormente.

Estudos foram realizados em humanos e demonstraram que o consumo regular de alimentos prebióticos resulta em mudanças estatisticamente significativas

na composição da microbiota do intestino ocasionando uma ampla gama de benefícios à saúde como o aumento das bifidobactérias, redução do risco de infecções e sintomas alérgicos, melhora do quadro clínico e bem estar dos pacientes com doenças intestinais inflamatórias, redução da incidência de tumores e cânceres e aumento da absorção de cálcio (ROBERFROID, 2002).

Outros estudos experimentais mostraram a eficácia da utilização da inulina e da oligofrutose como fatores bifidogênicos, ou seja, que estimulam a predominância de bifidobactérias no cólon. Conseqüentemente, há um estímulo do sistema imunológico do hospedeiro, uma redução nos níveis de bactérias patogênicas no intestino, um alívio da constipação, diminuição do risco de osteoporose devido à absorção aumentada de cálcio, redução do risco de arteriosclerose através da diminuição na síntese de triglicérides e ácidos graxos no fígado e diminuição do nível desses compostos no sangue (KAUR & GUPTA, 2002).

Para garantir um efeito contínuo, tanto os probióticos quanto os prebióticos devem ser ingeridos diariamente. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 5 a 20 g de inulina e/ou oligofrutose, geralmente com a administração durante o período de 15 dias. Assim sendo, para garantirem o estímulo da multiplicação de bifidobactérias no cólon, doses diárias de 4 a 5 g de inulina e/ou oligofrutose são suficientes (JELEN & LUTZ, 1998; CHARTERIS et al., 1998; NINESS, 1999; ROBERFROID, 1999).

2.4.3 Principais critérios para classificação como prebióticos

Para que uma substância possa ser definida como prebiótica, ela deve cumprir os seguintes requisitos (FOOKS et al., 1999): não deve ser hidrolisada e nem absorvida na parte superior do TGI; deve ser fermentada apenas por bactérias potencialmente benéficas no cólon promovendo o crescimento e estimulando a atividade metabólica das mesmas; e, ainda, deve alterar a composição da microbiota intestinal a favor de uma composição mais saudável.

O principal objetivo da ingestão de prebióticos é favorecer o desenvolvimento dos micro-organismos probióticos, principalmente do gênero *Bifidobacterium* (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996), pois os mesmos induzem diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro.

2.5 MEL DE ABELHA

Mel é o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas na maioria das vezes, a partir do néctar das flores, onde as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia (BRASIL, 2000). É a partir do néctar que é produzido a maioria dos méis do mundo. Este é uma solução de açúcar e água, podendo conter sacarose pura ou uma mistura de sacarose, glicose e frutose ou apenas glicose e frutose. (CRANE, 1983).

O mel é um alimento muito rico e de elevado valor energético, consumido mundialmente e de extrema importância para a saúde do organismo humano quando consumido puro, por apresentar diversas propriedades como antimicrobiana, curativa, calmante, regenerativa de tecidos, estimulante, dentre outras (BIZARRIA & FILGUEIRAS, 2003). É composto por, aproximadamente, 83% de carboidratos, sendo eles frutose, glicose, sacarose, maltose e oligossacarídeos. Os outros 17% de sua composição são referentes à água, proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais (Tabela 1) (RACOWSKI et al., 2007).

TABELA 1 – Composição nutricional média do mel (g/100g).

Nutrientes	Resultado médio (g em 100g de mel)	Faixa de variação (g/100g)
Água	17,1	12,2 – 22,9
Carboidratos totais	82,4	-
Frutose	38,5	-
Glicose	31,0	24,6 – 36,9
Sacarose	10	1,0 – 10,0
Maltose	7,2	1,7 – 11,8
Oligossacarídeos	1,5	0,1 – 8,5
Proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais.	0,5	-

Fonte: RACOWSKI et al. (2007).

Observando a tabela 1, verifica-se uma grande faixa de variação nos componentes nutricionais dos méis, já que esse resultado foi encontrado fazendo-se a média de diversas composições existentes para o mel. Isso ocorre porque sua composição depende, principalmente, das fontes vegetais das quais ele é derivado, além de outros fatores como o solo, a espécie da abelha, o estado fisiológico da colônia, o estado de maturação do mel, as condições meteorológicas na ocasião da colheita, entre outros (PAMPLONA, 1989; CAMPOS, 2003). Dessa forma, diversos fatores interferem em sua composição e por isso dois méis dificilmente serão idênticos (ABREU, 2003).

Os níveis de frutose e glicose estão diretamente ligados à qualidade do mel, como também às suas características físico-químicas. A glicose é o monossacarídeo responsável pela cristalização do mel. A consequência dessa precipitação da glicose é o aumento do teor de umidade, o que permite a multiplicação das leveduras osmofílicas presentes naturalmente no mel, levando à fermentação do produto. Méis com elevados teores de frutose e baixos teores de glicose são menos susceptíveis à cristalização, fenômeno este que diminui a aceitação do mel pelos consumidores (MOREIRA & MARIA, 2001).

O mel é um xarope natural contendo principalmente frutose 38,5% e glicose 31,3%. Contém também maltose 7,2%, sacarose 1,5% e uma variedade de oligossacarídeos representando 4,2% (SHIN & USTUNOL, 2005). Estes últimos podem estimular o crescimento, atividade e viabilidade de bactérias benéficas no trato gastrointestinal, uma vez que são considerados substâncias prebióticas (MACEDO et al., 2008).

A presença de uma série de dissacarídeos e trissacarídeos também têm sido relatadas por diversos autores (LEITE et al., 2000; SANZ, SANZ & MARTINEZ, 2004). Entre os açúcares encontrados a maltose apresentou-se em maiores níveis nos méis pesquisados (LEITE et al., 2000).

Já as proteínas estão presentes em quantidades traços no mel. Os ácidos orgânicos representam uma pequena porção nos méis, menos que 0,5% dos sólidos, tendo uma influencia direta do sabor do mel, sendo também importantes na inibição do crescimento de micro-organismos neste alimento (EMBRAPA, 2003).

O mel, além de sua qualidade como alimento, é um produto dotado de inúmeras propriedades terapêuticas, sendo utilizado pela medicina popular sob diversas formas como fitoterápicos. Destinam-se ao mel inúmeros efeitos benéficos

em várias condições patológicas (CAMARGO et al., 2003) como propriedades antissépticas e antibacterianas, fazendo com que ele seja utilizado como coadjuvante na área terapêutica em diversos tratamentos profiláticos (STONOGA & FREITAS, 1991).

Além de propriedades terapêuticas, o mel é considerado um alimento funcional que apresenta atividade prebiótica e tem como efeito a regulação do trânsito intestinal, regulação da pressão arterial, redução do risco de câncer e dos níveis de colesterol (ANJO, 2004). Entretanto, como os oligossacarídeos e carboidratos do mel variam de acordo com a sua origem floral, espera-se que o efeito prebiótico também se modifique de acordo com a flora (SILVA et al., 2006).

Dessa forma, diversos estudos com o mel têm sido realizados a fim de verificar as atividades antimicrobianas e prebióticas de leites fermentados adicionados de mel.

Foi realizado um estudo em que o objetivo foi verificar a ação antimicrobiana do mel em leite fermentado, determinando a faixa de concentração ideal do mel para inibição de bactérias mesófilas. Os resultados mostraram que o mel possuiu efeito inibidor sobre os micro-organismos do leite fermentado (*Lactobacillus* spp.) entre concentrações de 1,5% e 2,5% (RACOWSKI et al., 2007).

Diferentemente da pesquisa anterior, o estudo realizado por Curda e Plockova (1995) avaliou o efeito do mel em concentrações de (0,1,3,5 e 10%) adicionados em leite desnatado sobre o crescimento de *L. acidophilus* e cultura de bactérias mesófilas constituída de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*. Os resultados revelaram que apenas o *L. acidophilus* foi inibido e em concentrações superiores a 5% de mel.

Já em outras pesquisas, como a realizada por Chick, Shin e Ustinol (2001), a adição de mel em leites não foi inibitória para as culturas. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a influência do mel e de outros açúcares quanto à acidez e viabilidade de quatro culturas: *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrukeii* subsp *bulgaricus* e *Bifidobacterium bifidum*. O leite foi suplementado com 5% de mel, 5% de frutose e 5% de sacarose, separadamente. Como resultado, a adição de 5% de mel não foi inibitória para as culturas. Além disso, todas as culturas permaneceram viáveis, e ainda, a produção de ácido láctico pela *B. bifidum* foi significativamente maior na presença de mel em relação aos

outros açúcares. Isto porque o mel contém um alto teor de carboidratos fermentáveis, propiciando uma maior produção de ácido e, também, o abaixamento do pH (MACEDO, 2008).

Em seu estudo, VARGA (2006) verificou que a adição de 1 e 5% (p/v) de mel em iogurtes refrigerados por 6 semanas a 4°C não influenciaram significativamente as características sensoriais do alimento e nem a viabilidade da cultura composta por *Streptococcus termophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Contudo, existem outros estudos ainda que mostram que o mel estimula o crescimento e a viabilidade das culturas probióticas. Um desses estudos foi o realizado por Macedo et al., (2008). O objetivo foi estudar o efeito do mel, na concentração de 3%, sobre o crescimento e a viabilidade de culturas de lactobacilos e bifidobactérias em leite fermentado durante 46 dias de armazenamento a 7 °C. Os autores encontraram que, no caso dos lactobacilos, o mel não interferiu em sua viabilidade, porém, nas bifidobactérias, o mel exerceu efeito positivo significativo no crescimento e na viabilidade. Eles verificaram também que, nas duas cepas, o mel contribuiu para acelerar o metabolismo dos micro-organismos, ou seja, o processo de fermentação foi mais rápido que o usual.

No estudo realizado por Kajiwara, Gandhi e Ustunol (2002), eles verificaram o crescimento de bifidobactérias em meio de cultura suplementado com 5% de mel, por 48 horas de incubação a 37°C e anaerobiose. Esses autores relataram que houve aumento significativo do crescimento das culturas nos meios suplementados com mel ou oligossacarídeos.

Considerando o que foi exposto, percebe-se que, o mel atua de duas formas quando suplementados em meios contendo micro-organismos: como antimicrobiano e como prebiótico. O que provavelmente as diferencia é a concentração de mel adicionado. Dessa forma, tem-se que encontrar uma concentração adequada para que o mel atue como prebiótico sem inibir o crescimento dos micro-organismos probióticos, já que em altas concentrações ele atua como antimicrobiano e em baixas, como prebióticos. Isso é bastante difícil porque o efeito prebiótico do mel depende da quantidade de carboidratos fermentáveis presentes e a grande maioria dos méis apresentam composições bastante diferentes uns dos outros. Entretanto, como a maioria dos estudos indica que o mel adicionado entre 3% e 5% é eficaz como prebiótico, essas concentrações

serão as utilizadas para a elaboração das bebidas fermentadas no presente estudo (CURDA & PLOCKOVA, 1995; CHICK et al., 2001; KAJIWARA et al., 2002; MACEDO et al., 2008).

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria esporogênica, anaeróbia, comumente encontrada em solos, sedimentos marinhos e de águas doces, bem como no trato intestinal de homens e animais. Condições industriais inadequadas podem ocasionar o seu desenvolvimento e este, por sua vez, produz toxina se lhe forem dadas condições como potencial redox, pH, temperatura e umidade. As fontes de veiculação por alimentos ocorrem através dos legumes (57%), pescados (15%), frutas em conservas e condimentos, incluindo o mel (8%) (PIRES, 2011).

Alimentos de origem animal como carnes e derivados são os principais responsáveis por veicular *Clostridium botulinum* ao homem (JUNEJA et al., 1997). O mel também pode ser um excelente veiculador de *C.botulinum*, sendo que as toxinas dos tipos A e B são predominantes (HUHTANEN et al., 1981).

O mel utilizado na elaboração das bebidas foi avaliado microbiologicamente quanto à pesquisa de esporos de bactérias mesófilas anaeróbicas apesar de não existirem padrões microbiológicos atuais para este produto. Esta análise foi realizada com o intuito de pesquisar a possível presença de *Clostridium botulinum*, uma vez que as características intrínsecas deste alimento (como a baixa atividade de água) pode favorecer a contaminação por esporos deste micro-organismo.

2.6 SIMBIÓTICOS

O termo foi originalmente empregado em inglês *synbiotic*, aonde, *syn* vem de sinergia e *biotic* para a vida (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Refere-se a alimentos ou suplementos alimentares contendo micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos (GIBSON, 1999; GIBSON & FULLER, 2000) que podem aumentar a sobrevivência das cepas durante a passagem pelo trato digestivo superior e chegarem mais viáveis ao cólon, pelo fato de seu substrato estar disponível para fermentação (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Ou seja, são produtos com as características funcionais dos dois grupos que, atuando juntos, vão trazer benefícios à saúde do hospedeiro.

O alimento simbiótico age de duas formas para aumentar a população de bactérias benéficas no trato intestinal: a primeira é devido ao consumo do alimento contendo micro-organismos probióticos; a segunda, através do aumento do número de bactérias benéficas já existentes no trato intestinal por meio do consumo de prebióticos, que vão estimular os micro-organismos endógenos específicos do hospedeiro no seu sítio de colonização (COLLINS & GIBSON, 1999; SCHREZENMEIR & VRESE, 2001; TUOHY et al., 2003).

Para o desenvolvimento adequado de alimentos simbióticos é necessário selecionar as linhagens de micro-organismos com melhor capacidade de utilização do prebiótico que será adicionado ao produto, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis (FERREIRA & TESHIMA, 2000)

Apesar do conceito de simbióticos ser relativamente novo, o assunto tem despertado o interesse de vários pesquisadores nesta área. Na medida em que esses estudos são apresentados e comprovados, o mercado tende a absorver rapidamente essas novas idéias (TUOHY et al., 2003).

Modler (1994) identificou alguns benefícios decorrentes da adição de, aproximadamente, 15 gramas por dia de frutooligossacarídeos à dieta humana, como o acréscimo de 10 vezes na população de bifidobactérias presentes no cólon, redução de 0,3 unidades no valor do pH intestinal e, ainda, decréscimo na população das enterobactérias no intestino grosso.

Mondragón-Bernal (2004) realizou um estudo com a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja e verificou que a mistura dos probióticos *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* suplementado com frutooligossacarídeos, após 16 a 24 horas de fermentação atingiu uma contagem de 10^{10} UFC/mL de bifidobactérias, o que é considerado uma alta população para *B.longum*.

Aragon-Alegro et al. (2007) produziram uma mousse de chocolate simbiótica com micro-organismos probióticos (*L.paracasei* subsp *paracasei*) e ingrediente prebiótico inulina. O alimento foi monitorado durante estocagem de 28 dias a 5° C e mostrou-se um ótimo veículo para o *L.paracasei*. Já a inulina não interferiu na viabilidade do micro-organismo que se manteve em um nível de 10^7 UFC/g até o 28° dia de armazenamento.

Dessa forma, percebe-se que está havendo um aumento no interesse e, conseqüentemente, no número de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de produtos simbióticos visando uma produção de alimentos cada vez mais saudáveis.

2.7 EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA

Devido à soja ser uma leguminosa com abundância no Brasil, fonte apreciável de proteínas e lipídeos, e ainda, possuir boas características químicas e nutricionais, têm-se desenvolvido importantes trabalhos visando o seu aproveitamento na obtenção de produtos mais atrativos, aceitáveis e de bom gosto (MONDRAGÓN-BERNAL, 2009) como tofu, iogurte, sorvete, leite condensado, suco de frutas e, principalmente, EHS.

O EHS, conhecido popularmente como “leite” de soja, é um dos derivados não fermentados obtido a partir do grão da leguminosa, sendo de fácil obtenção. Esse produto é bastante utilizado na alimentação nos países orientais, mas apesar do grande potencial nutricional, há uma barreira para o seu uso na nossa cultura, devido ao sabor desagradável que apresenta (MACFIE et al., 1989) proveniente da auto-oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados e/ou da ação enzimática das lipoxigenases que formam compostos voláteis responsáveis pelos sabores descritos como rançoso ou de feijão cru (AMES, 1988; LIU, 1997; MACLEOD & TORRES-PENARANDA et al., 1998).

Entretanto, recentemente a indústria nacional tem feito uso de novas tecnologias na obtenção do EHS para o mercado brasileiro apresentando uma melhor qualidade sensorial. Novos produtos comerciais à base de extrato hidrossolúvel em combinação com sucos de frutas têm obtido êxito no mercado, indicando que os consumidores podem estar mudando suas atitudes e conceitos com relação aos produtos à base de soja (BEHRENS & SILVA, 2004).

Uma tecnologia que está sendo bastante utilizada para melhorar a qualidade sensorial de EHS é a fermentação. Aliada à suplementação com sacarose, glicose e lactose (BEHRENS et al., 2004) a fim de servir de substrato para as bactérias fermentadoras, esse processo tecnológico é conhecido por aumentar o valor nutricional, melhorar a aceitabilidade dos produtos derivados da soja (ROSSI et al., 1999) e, ainda, reduzir os açúcares que causam flatulência (CHAMPAGNE et al.,

2005), os oligossacarídeos, por não serem digeridos pelo organismo humano. Concomitantemente com a fermentação, outra tecnologia no qual o EHS de soja está sendo bastante submetido é o tratamento térmico. Na presença de altas temperaturas, as enzimas lipoxigenases presentes no grão são inativadas, não formando os compostos voláteis de baixo peso molecular, responsáveis pelo gosto desagradável desses alimentos. São inativados também os inibidores de proteases antitripsina e hemaglutinina considerados fatores indesejáveis por diminuir a digestibilidade protéica (HOU et al., 2000).

Produtos derivados da soja têm se revelado veículos apropriados de culturas probióticas (KOMATSU et al., 2008). A presença de prebióticos no EHS como os oligossacarídeos rafinose e estaquiose e a presença de outros fatores bifidogênicos como os outros açúcares - sacarose, frutose, glicose, galactose -, as vitaminas do complexo B e as fontes de nitrogênio das proteínas da soja, fazem dessa bebida um meio excelente para o crescimento das bifidobactérias (CHOU E HOU, 2000; HOU et al., 2000; CHIARELLO, 2002) e de outros micro-organismos probióticos.

Estudos recentes têm indicado uma série de benefícios para a saúde com o sinergismo entre os produtos da soja e os micro-organismos probióticos. Quando adicionadas em meio com soja, as cepas isoladas ou em misturas, irão consumir os mono, di e oligossacarídeos provenientes do grão e do substrato que for inserido, produzindo principalmente ácido láctico com leve produção do ácido acético o que é bastante benéfico sensorialmente, tanto pela diminuição do flavor original da soja quanto pela melhora na digestibilidade (HOU et al., 2000; MONDRAGÓN-BERNAL, 2004).

Um estudo em que foi possível verificar esse sinergismo foi realizado por Mondragón-Bernal (2004). Nesta pesquisa, estudou-se o desenvolvimento de algumas espécies de probióticos (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) em cultura pura e em mista, em extrato hidrossolúvel desengordurado de soja, com e sem adição de frutooligossacarídeos. Verificou-se que as culturas puras de *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *B. longum* têm ótimo crescimento em EHS, sendo um excelente meio para o cultivo de probióticos. Cinco anos depois, Mondragón-Bernal (2009), avaliou o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* como cultura pura e em mistura com os probióticos anteriormente estudados em EHS com e sem adição de sacarose, e observou que o

crescimento do inóculo puro de *Lactobacillus rhamnosus* foi baixo, não atingindo uma boa quantidade como no caso dos outros microrganismos. Já em meio contendo sacarose e a mistura de probióticos, além de aumentar a contagem total dos probióticos na bebida houve um favorecimento da estabilidade do produto em relação à sinérese e ao comportamento reológico, mostrando assim, que o sinergismo atuou de maneira positiva no crescimento dos probióticos.

Em termos de valor nutritivo o extrato de soja compara-se ao leite de vaca, por conter: entre 3 a 4 % de proteínas, sendo deficiente nos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína; é boa fonte de vitamina B, com exceção da B12, por não ser um produto de origem animal; e, ainda, é fonte de oligossacarídeos, a rafinose e a estaquiose (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004). Porém, o conteúdo de cálcio é baixo, contendo apenas 4 mg em 100 mL de EHS contra 123 mg/100 mL de leite de vaca (PHILIPPI, 2002).

Segundo o Instituto Nacional de Doenças Digestivas, Renais e Diabetes, nos Estados Unidos, cerca de 75 % da população mundial é intolerante à lactose. Assim, a substituição do leite de vaca pelo EHS seria perfeita nutricionalmente, quando se referisse à qualidade e quantidade de proteína, porém, ao considerarmos a quantidade dos micronutrientes como, por exemplo, o cálcio, o EHS não se torna adequado substituto do leite bovino, devido ao baixo conteúdo desse mineral (HEANEY et al., 2000).

2.8 VIDA DE PRATELEIRA

Os alimentos que foram processados, mesmo tendo a deterioração microbiana sob controle, passam por diversas transformações no seu período de vida útil como alterações na cor, sabor, consistência, qualidade nutricional e funcional, dentre outras, sendo vários os fatores que influenciam na velocidade dessas reações como temperatura, umidade, atividade de água, acidez, teor de oxigênio, etc. Além disso, por serem considerados materiais biológicos, os alimentos são sistemas bastante complexos onde ocorrem diversas reações ao mesmo tempo com diferentes cinéticas, sendo assim, difícil determinar com precisão o seu tempo de vida de prateleira (MOURA & GERMER, 2004).

Vida de prateleira é o período de tempo no qual um alimento se mantém seguro para o consumidor, mantendo suas características sensoriais, físicas, químicas e funcionais desejadas, sob as condições de armazenagem recomendadas na embalagem. Ou seja, o alimento enquanto válido tem que cumprir duas condições essenciais: segurança e qualidade (DIAS, 2007).

A vida de prateleira de um alimento é normalmente estimada com base em produtos semelhantes existentes no mercado. No entanto, em alimentos que se tenha que determinar a vida de prateleira, a maneira mais usual é simular as condições nas quais o produto é submetido, desde a produção até a estocagem, registrando as suas evoluções e alterações ao longo do tempo (DIAS, 2007). Para isso, identificam-se quatro fatores fundamentais para a determinação da vida útil do produto: a sua formulação, o seu processamento, a embalagem utilizada e as condições de estocagem. Depois, é preciso monitorar e controlar os parâmetros desses processos, e assim, determinar o final do tempo de vida de prateleira, ou seja, o momento em que o produto não é mais seguro para o consumo (LEWIS & DALE, 1996). Porém, esse tipo de determinação é mais utilizado para produtos com período de validade curto, já que para os produtos com longo período de validade, isso significa uma grande disponibilidade de tempo e dinheiro para as sucessivas análises (DIAS, 2007).

2.8.1 Vida de prateleira de leites fermentados à base de EHS

Como foi citada anteriormente, a vida de prateleira dos alimentos depende basicamente de quatro fatores: formulação, processamento, embalagem e condições de estocagem.

Para a formulação e processamento é preciso estudar as características intrínsecas do produto que podem influenciar na sua vida útil para sabermos quais são as possíveis reações que podem ocorrer durante o processamento e, ainda, garantir a qualidade dos ingredientes através das boas práticas de fabricação. O leite fermentado de soja é um produto com baixo pH e alta acidez, podendo ocorrer desestabilidade da estrutura protéica e coagulação, visto que as proteínas do leite de soja apresentam ponto isoelétrico em pH próximos a 5,8 (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004). A alta acidez acaba por interferir também nas características organolépticas do produto, pois apresentará um gosto “amargo”. A alta atividade de

água faz com que o produto seja perecível e necessite de refrigeração após o seu processamento para a manutenção das características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, no caso, a viabilidade das cepas probióticas. Por ser um alimento rico em proteína e por conter culturas lácteas, ocorrerá proteólise por esses microrganismos e essa deverá ser monitorada visto que se a quebra de proteínas for muito intensa poderá ocorrer modificação na consistência da bebida, diminuindo a sua aceitação pelos consumidores. Por se tratar de um alimento fermentado, deverá ser monitorada a acidez e o pH já que durante a fermentação há consumo de glicose e a formação de ácidos pelas bactérias. E por ser um alimento probiótico, deverá ser monitorada a viabilidade dos micro-organismos durante o processamento e, depois, durante o armazenamento do produto (SOUZA, 1990; ELLIS, 1996; VASILJEVIC & SHAH, 2008; KOMATSU et al., 2008).

Por fim, as condições de estocagem são bastante importantes para que o produto mantenha a sua qualidade durante o armazenamento. Neste caso, as condições são um ambiente refrigerado com temperatura entre 0 a 8°C para que ocorra uma diminuição nas reações de transformação do produto, já que nesse ambiente as velocidades das reações químicas, enzimáticas e microbiológicas são diminuídas (ELLIS, 1996).

Na maioria dos trabalhos envolvendo a determinação da vida de prateleira em produtos fermentados de soja, as bebidas foram armazenadas em embalagens estéreis, de vidro ou de plástico, a 4°C, durante aproximadamente 28 dias, sendo realizadas análises nos dias 1, 7, 14, 21 e 28. As análises realizadas, na grande parte dos estudos, foram: pH, acidez total titulável, sinérese e viabilidade dos micro-organismos probióticos. Também foram realizadas análises sensoriais para verificar se houve mudança na aparência, no sabor e na consistência dos produtos durante a estocagem. O que é diferenciado nesses trabalhos é a frequência durante os 28 dias de realização dos testes sensoriais. Alguns autores avaliaram apenas no 1º e 28º dia; outros, no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia, juntamente com as outras análises. Poucos autores relataram terem realizado a análise microbiológica dos produtos com o intuito de avaliar a deterioração por microrganismos patogênicos ou deteriorantes (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004; HAULY et al., 2005; KEMPKA et al., 2008; EVANGELISTA, 2011).

Apesar de existirem vários métodos para a determinação da vida de prateleira de um produto, como análises dos produtos, análises estatísticas, ou

ainda, estimativas com bases nas datas de validades de outros produtos, devemos levar em consideração que qualquer uma dessas determinações raramente vai ser igual à realidade, pois erros e problemas irão sempre existir durante a cadeia de distribuição e, principalmente, durante o manuseio pelo consumidor, razão pelas quais muitas empresas optam por uma margem extra de segurança nas datas de validade (DIAS, 2007).

Esses erros existem por se tratar de alimentos, que são sistemas extremamente complexos, nos quais diversas reações de deterioração ocorrem simultaneamente, com diferentes cinéticas, dificultando a previsão do tempo em que o produto se mantém viável. Mesmo tendo a deterioração microbiana sob controle, outras reações tais como alterações de cor, sabor, textura e qualidade nutricional e funcional podem comprometer o alimento. E são vários os fatores que vão influenciar a velocidade dessas reações como a temperatura, umidade, atividade de água, acidez, teor de oxigênio, presença de catalisadores, dentre outros (EVANGELISTA, 2011).

2.9 ANÁLISE SENSORIAL

A exigência cada vez maior por parte dos consumidores esclarecidos aliados à busca incessante por uma alimentação mais saudável e nutritiva contribui para que haja um aumento crescente na demanda por desenvolvimento de novos produtos e processos. Porém, é importante salientar que os alimentos não devem atender apenas as necessidades nutricionais, uma vez que os atributos sensoriais como aparência, consistência, sabor, dentre outros, são de extrema importância para a aceitação de novas formulações no mercado (DELIZA et al., 2003; BARBOZA et al., 2003).

Ainda que os nutrientes sejam importantes, os alimentos não podem ser vistos apenas como uma forma de veiculá-los, uma vez que possuem significados culturais, comportamentais e afetivos intrínsecos a cada um deles e que jamais poderiam ser desprezados. A alimentação deve ocorrer, portanto, em função do consumo de alimentos e não de nutrientes. Os produtos alimentícios apresentam cor, forma, aroma, sabor e textura, e todos esses componentes precisam ser levados em consideração no desenvolvimento de novos produtos (BRASIL, 2008).

A qualidade de um alimento nos atributos sabor, aroma, textura e aparência é avaliada através de testes de análise sensorial. Essa análise é bastante usada em pesquisas por indústrias para verificar a preferência e aceitação de um determinado produto antes de ser lançado no mercado, a fim de apenas iniciar a produção de produtos que serão realmente consumidos e, conseqüentemente, proporcionarão lucros à empresa (DUTCOSKY, 1996).

A Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – define a análise sensorial como uma metodologia científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993).

De acordo com Stone & Sidel (2004), apenas a partir do ano de 1979 a qualidade sensorial dos alimentos passou a ser considerada como resultado da interação entre o alimento e o homem. No início, antes dos anos 40, ela era determinada exclusivamente pelo proprietário da indústria. Nas décadas de 40 e 50, foi iniciada a utilização de métodos químicos e instrumentais para a determinação da qualidade sensorial, devido à presença nas indústrias alimentícias de técnicos das áreas farmacêuticas e químicas. Já nas décadas de 50 e 70, houve a inclusão do homem como instrumento de medida nas características sensoriais dos alimentos culminando com o reconhecimento da qualidade sensorial como resultado da interação entre alimento e homem, bem ao final da década de 70, no ano de 1979 (STONE & SIDEL, 2004).

Nas indústrias de alimentos mais modernas todas as atividades são desenvolvidas baseadas nas preferências dos consumidores (KOEHL et al., 2008) tornando assim, a avaliação sensorial, um importante instrumento de auxílio para o mercado alimentício.

Os métodos sensoriais se dividem em dois grupos: analíticos ou objetivos e afetivos ou subjetivos (ABNT, 1993).

Os métodos analíticos ou objetivos podem ser subdivididos em: discriminativos (ou de diferença), de sensibilidade e descritivos. Os testes de diferença indicam se existe ou não diferença perceptível entre as amostras. Os testes de sensibilidade medem os limites de percepção de um ou mais estímulos pelos órgãos dos sentidos. Os métodos descritivos são aplicados com o objetivo de caracterizar qualitativa e quantitativamente das amostras (ABNT, 1993).

Já os testes subjetivos ou afetivos são aqueles que visam conhecer a aceitação do consumidor sobre o produto (testes de aceitação) e/ou a preferência no julgamento de diferentes amostras (testes de preferência) (ABNT, 1993). Têm como objetivo principal avaliar a resposta pessoal (preferência ou aceitação) de consumidores habituais ou potenciais a um produto. São classificados em quantitativos e qualitativos, sendo que os testes afetivos quantitativos são aqueles que determinam as respostas de um grande grupo de consumidores ($n = 50$ até mais de 100) para um grupo de perguntas referentes à aceitação e preferência dos produtos (MEILGAARD et al., 2007) e podem ser aplicados nas seguintes situações:

- Na determinação da aceitação e preferência global de um produto por meio de uma amostra de consumidores representativa da população a qual o produto se destina;
- Na determinação da aceitação e preferência do produto em relação aos atributos sensoriais do mesmo como aparência, aroma, sabor, textura, dentre outros visto que o estudo das variáveis intrínsecas (relacionadas ao alimento) e extrínsecas (relacionadas à embalagem e à rotulagem) do produto pode levar a um melhor conhecimento dos fatores que afetam a aceitação e preferência do mesmo;
- E, por fim, para medir as respostas de aceitação de um produto pelos consumidores em relação a um atributo sensorial específico, como exemplo, nos testes com escalas hedônicas, escalas de intensidade ou escalas do ideal (MEILGAARD et al., 2007).

De acordo com a ABNT (1993), o termo “aceitação” é utilizado para caracterizar o ato de um determinado indivíduo ou população ser favorável a consumir um produto. “Aceitabilidade” é o grau de aceitação deste produto que já foi aceito por um determinado indivíduo ou população, em termos de suas propriedades sensoriais. Ou seja, a mensuração da aceitação. Já “preferência” é a expressão do estado emocional ou reação afetiva de um indivíduo que o leva a escolha de um produto sobre outro(s).

Escalas hedônicas são empregadas para indicar o grau de aceitação ou de rejeição de um produto o que significa indicar o grau do quanto gostaram ou desgostaram do produto (MEILGAARD et al., 2007). A seleção das escalas a serem utilizadas em um teste de aceitação é considerada um dos pontos mais importantes no planejamento experimental. Sua escolha tem que ser baseada de acordo com os objetivos do teste, o público-alvo e as características do produto (STONE & SIDEL, 2004).

As escalas balanceadas são as melhores por apresentarem de forma igualitária o mesmo número de termos positivos e negativos, o que não ocorre com as escalas não balanceadas. Estas, não são muito utilizadas por apresentarem número maior de categorias do lado positivo da escala em relação ao negativo. Assim, o lado negativo acaba apresentando os termos mais espaçados, sendo de difícil compreensão para o provador e fornecendo resultados frequentemente errôneos. As escalas hedônicas verbais mais indicadas são as de nove, sete e cinco pontos, as quais trazem como pontos âncora superior e inferior as expressões “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”, respectivamente, e como ponto central “não gostei nem desgostei” (FERREIRA et al., 2000; MEILGAARD et al., 2007).

As condições psicológicas dos provadores podem afetar diretamente os resultados dos testes sensoriais, assim como as condições ambientais. Para se realizar corretamente a avaliação sensorial de alimentos, muitas variáveis precisam ser rigorosamente controladas dentre elas, as que merecem destaque são o ambiente dos testes, a preparação e apresentação das amostras e a equipe de provadores (PIZARRO, 2003). Entre os vários tipos de testes sensoriais de aceitação existentes o mais frequentemente utilizado é aquele conduzido em ambiente de laboratório, devido à possibilidade de assegurar o controle de todas as condições do mesmo (STONE & SIDEL, 2004).

Para a avaliação de produtos fermentados, a escala hedônica de nove pontos é a mais utilizada (DUTCOSKY, 2007), ela é convertida em escores numéricos que são analisados estatisticamente para determinar a diferença no grau de preferência entre amostras (IFT, 1981).

O teste de “Intenção de Compra” é comumente aplicado em paralelo ao de aceitação com o objetivo de prever a intenção de compra de produtos em desenvolvimento ou avaliar a atitude de compra do consumidor em relação àqueles

produtos já existentes no mercado alimentício. De forma prática, com os resultados deste teste, pode-se obter respostas para ajustar a produção e determinar estratégias de divulgação dos produtos, ou ainda, estimar a demanda do mercado consumidor de um novo produto (ARMSTRONG et al., 2000).

De acordo com Meilgaard et al. (2007) a escala de Intenção de Compra deve ser composta por cinco pontos na qual 1 corresponde a “certamente não compraria”; 2 a “possivelmente não compraria”; 3 a “talvez comprasse, talvez não comprasse”; 4 a “possivelmente compraria”; e, por fim, 5 a “certamente compraria”.

2.10 METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS FERMENTADAS

A tecnologia das fermentações vem sendo bastante estudada e revisada por muitos autores como Rasic & Kurmman (1992), Tamime & Robinson (2001), Dave & Shah (1996, 1998), Vinderola & Reinheimer (1999, 2000), dentre outros pesquisadores. Entretanto, a maior parte da metodologia de produção de leites (leite de vaca) fermentados se mantém a mesma como, por exemplo, a homogeneização dos ingredientes e uso de altos tratamentos térmicos para a esterilização do leite.

Alguns aspectos da metodologia de produção que devem ser tratados com maiores cuidados por variar de acordo com o produto a ser desenvolvido (como iogurtes ou leites fermentados ou bebidas lácteas, etc) incluem: micro-organismos que constituirão as culturas iniciadoras; temperatura e período de incubação; proporção do inóculo e produção da cultura iniciadora. O uso de equipamentos de desaeração do leite é altamente necessário quando se tratar de fermentação por bifidobactérias, visto que a presença de oxigênio no leite pode prolongar o período de incubação das culturas (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004).

2.10.1 Processo fermentativo

A atividade fermentativa dos micro-organismos é responsável pela produção e características de muitos alimentos como queijos, iogurtes, leites fermentados, conservas, chucrute e linguiças. Os alimentos fermentados são considerados mais estáveis por possuírem uma vida de prateleira maior do que a matéria prima da qual foram originados. Além disso, possuem aroma e sabor

característicos que resultam direta ou indiretamente dos organismos fermentadores (JAY, 2005).

Parâmetros intrínsecos e extrínsecos dos alimentos interferem na atividade de crescimento destes micro-organismos como, por exemplo, quando o alimento in natura é rico em açúcares livres e é acidificado, leveduras irão se desenvolver rapidamente produzindo álcool e restringindo, dessa forma, as atividades de outros micro-organismos naturalmente presentes no alimento. Entretanto, se a acidez de um produto permitir um bom crescimento bacteriano e, ao mesmo tempo, este alimento conter altas concentrações de açúcares simples, é de se esperar o crescimento de bactérias ácido-láticas (JAY, 2005).

2.10.2 Definição de fermentação

Prescott e Dunn (1957) e Doelle (1975) discutiram a história do conceito de fermentação e concluíram que o termo é normalmente definido como “um processo nas quais transformações químicas são realizadas em um substrato orgânico pela ação de enzimas produzidas por micro-organismos”. Já bioquimicamente, a fermentação é o processo metabólico nos quais carboidratos e compostos relacionados são parcialmente oxidados, resultando em liberação de energia. (JAY, 2005).

2.10.3 Bactérias lácticas e a fermentação láctica

A fermentação láctica é realizada pelas bactérias pertencentes ao grupo láctico ou bactérias lácticas. Fazem parte deste grupo os seguintes gêneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus* (FRANCO, 2008) dentre outros. Todos os membros desse grupo apresentam a mesma característica de produzir ácido láctico a partir de hexoses (JAY, 2005).

As bactérias ácido-láticas são divididas em dois grupos, com base em seus produtos finais no metabolismo da glicose. Aquelas que produzem ácido láctico como único ou principal produto da fermentação da glicose são designadas homofermentativas como as bactérias dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e alguns *Lactobacillus*. Já as bactérias lácticas que

produzem a mesma quantidade molar de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir de hexoses são chamadas de heterofermentativas e são exemplos as bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e alguns *Lactobacillus* (JAY, 2005). Estas espécies são mais importantes do que os homofermentativos por produzirem substâncias responsáveis pelo aroma e sabor, tais como acetaldeído e diacetil (FRANCO, 2008).

2.10.4 Vias fermentativas

As diferenças entre as bactérias lácticas homo e heterofermentadoras têm base genética e fisiológica. As homoláticas apresentam as enzimas aldose e hexose-isomerase, mas não têm a fosfocetolase, e utilizam a via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para produzir duas moléculas de lactato para uma de glicose. Já as heteroláticas apresentam a fosfocetolase, mas não a aldolase e a hexose-isomerase e, em vez de utilizarem a via EMP na degradação de glicose, usam ou a via do monofosfato-hexose ou a via das pentoses (FRANCO, 2008).

Mais recentemente, o gênero *Lactobacillus* foi organizado em três grupos baseados basicamente nas características fermentativas (STILES & HOLZAPFEL, 1997):

- Homofermentativas obrigatórias → inclui as espécies *L.acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L.delbrueckii*, etc. Estas são termobactérias e não fermentam pentoses;
- Heterofermentativas facultativas → inclui as espécies *L.casei*, *L.plantarum*, *L.sake*, etc. Estas bactérias fermentam pentoses;
- Heterofermentativas obrigatórias → inclui as espécies *L.fermentum*, *L.brevis*, *L.reuteri*, *L.sanfrancisco*, dentre outras. Elas produzem CO₂ a partir da glicose.

As bactérias ácido-láticas precisam de aminoácidos, vitaminas B e bases purídicas e pirimídicas para o seu crescimento/desenvolvimento. Embora sejam mesofílicas, algumas delas podem crescer em temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 45°C. Com relação ao pH, algumas podem crescer abaixo de 3,2, outras acima

de 9,6, mas a maioria cresce numa faixa de pH entre 4,0 e 4,5. As bactérias ácido-láticas são pouco proteolíticas e lipolíticas (JAY, 2005).

2.10.5 Metodologia de produção do EHS

Entre os métodos utilizados para a obtenção do EHS destacam-se (SAAD, 2011):

- **Método de Cornell (*Cornell method*):** é também conhecido como método de trituração a quente. Nesse método, a soja descascada, não deixada de molho, é esmagada em um triturador pré-aquecido com água quente e a suspensão obtida é mantida em temperatura elevada (entre 80°C e 100°C) no triturador para completar a inativação da lipoxigenase.
- **Método de Illinois (*Illinois method*):** desenvolvido na Universidade de Illinois – EUA, também denominado método do pré-branqueamento, é iniciado com um branqueamento em água fervente dos grãos, para garantir a inativação enzimática. Os grãos são drenados e triturados com água fria, a suspensão é aquecida a 93,3°C e então homogeneizada.
- **Método da hidratação rápida (*Rapid hydration hydrothermal cooking*):** A soja moída é transformada em farinha, sendo depois misturada com água quente para a obtenção da suspensão, que é rapidamente submetida a uma corrente de vapor a 154°C por 30 segundos, para a inativação da lipoxigenase. A suspensão é, então, resfriada, ajustada para 10% de sólidos com adição de água e, finalmente, centrifugada.
- **Método empregado na Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja (UNISOJA):** a soja descascada é imediatamente levada a um cozimento a 95°C por 14 minutos. Os grãos, depois de escorridos, são resfriados, adicionados de antiespumante e levados a uma extratora denominada de unidade básica de extração, onde os grãos são triturados em um sistema de moinho de facas e o resíduo é separado

do extrato hidrossolúvel por processo de centrifugação e filtração em telas metálicas. O extrato obtido é automaticamente misturado, em proporção pré-definida, com a calda (produto constituído de água, açúcar, sal, bicarbonato de sódio, corante e aromatizante), acrescido de seis partes de água, pasteurizado e embalado.

Uma etapa importante da produção do EHS é o tratamento térmico, pois permite a inativação da enzima lipoxigenase que é a responsável por promover a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, com consequente formação de aldeídos (n-pentanal e n-hexanal), compostos conhecidos por serem responsáveis pelo sabor desagradável dos derivados de soja. Além disso, o aquecimento permite a redução de fatores antinutricionais presentes no grão in natura como, por exemplo, os inibidores da tripsina (MAIA et al., 2006).

A indústria alimentícia vem investindo atualmente no aprimoramento do processo de obtenção do EHS, disponibilizando no mercado uma grande variedade de produtos. E ainda, o EHS constitui-se no ingrediente base, matéria prima, para a elaboração da maioria dos produtos derivados da soja com características probióticas e prebióticas. Um exemplo desses produtos é o “iogurte” de soja (SAAD, 2011).

2.10.6 Metodologia usual de produção do “iogurte” de soja

O EHS é misturado com óleo de soja (0,8% v/v), emulsificante (0,3% p/v), lactose (1,0% p/v), utilizada como carboidrato fermentável pelos micro-organismos e sacarose (6% p/v), com a finalidade de conferir o grau de doçura desejável. Todos esses constituintes são homogeneizados por 5 minutos em agitador mecânico de pás, em velocidade máxima. Em seguida, é iniciado o tratamento térmico da mistura, sendo que a 80°C é adicionado o espessante (gelatina – 0,5% p/v) e os sólidos desengordurados de leite (2,5% p/v), com a finalidade de melhorar a textura e de fornecer ao produto acabado um leve sabor e aroma de produto lácteo. A mistura é aquecida até 95°C e mantida nessa temperatura por 5 minutos, sendo, em seguida, resfriada a 45°C e inoculada com 3% p/v de cultivo bacteriano. Após a inoculação, a mistura é incubada (42°C ou 37°C, dependendo do cultivo) por um período suficiente para que o pH diminua de 6,7 para 4,3. Normalmente, esse tempo corresponde a

aproximadamente 6 horas de fermentação. Finalmente, o produto é resfriado e mantido sob refrigeração por 12 horas, período importante para que o estabilizante exerça o seu papel, podendo depois ser corado, aromatizado, homogeneizado e embalado (SAAD, 2011).

2.10.7 Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) de alimentos com soja

Foram seguidos os padrões de identidade e qualidade (PIQ) para alimentos com soja, mais especificamente baseados na RDC nº 91, de 18 de outubro de 2000 que trata do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimento Com Soja (ANVISA, 2000).

2.10.8 Metodologia de produção de extrato hidrossolúvel de soja fermentado por lactobacilos probióticos

Nos trabalhos relacionados ao desenvolvimento de bebidas fermentadas à base de EHS, as metodologias de produção são bastante semelhantes, variando apenas a concentração do inóculo, a temperatura de incubação, as culturas probióticas utilizadas e, conseqüentemente, o tempo de fermentação das bebidas (KOPPER, 2009; MONDRAGÓN-BERNAL, 2004; BEHRENS, 2002; BARBOSA, 2007; EVANGELISTA, 2011). Assim, apresentam basicamente o mesmo fluxograma de produção como será mostrado a seguir na figura 1:

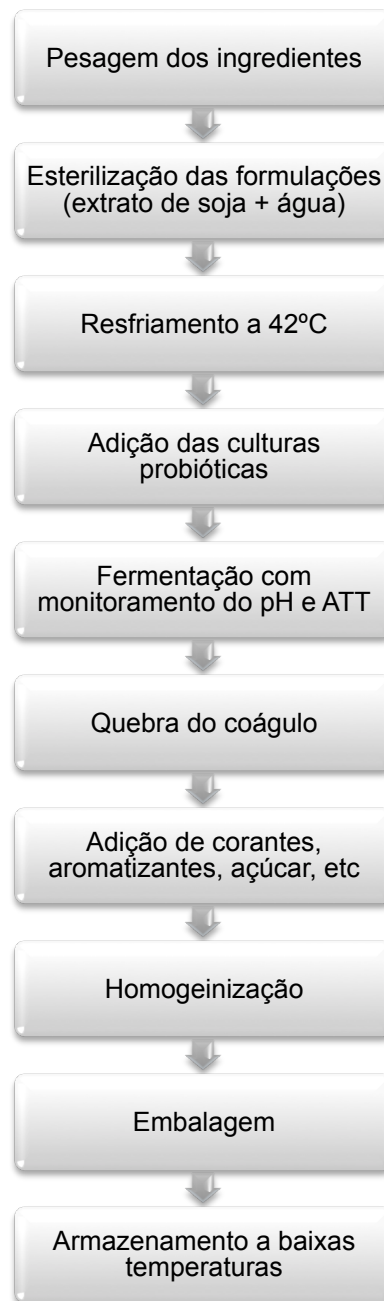


FIGURA 1 - Fluxograma da metodologia de produção de bebidas fermentadas à base de EHS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria prima

Para o preparo das bebidas fermentadas foi utilizado como matéria prima: extrato de soja em pó Provesol da Olivebra®, mel de abelha Santa Bárbara®, base

mascarante para leite de soja Lactosoja® e aroma/essência com corante (emulsão) sabor mel Lactosoja®. No apêndice A encontra-se a ficha técnica do extrato de soja em pó Provesol.

3.2 Culturas probióticas

Foram utilizadas as culturas puras comerciais liofilizadas em embalagens lacradas dos micro-organismos probióticos pertencentes às espécies *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* fornecidas pela Christian Hansen®.

3.3 Análises microbiológicas e físico-químicas das matérias-primas

3.3.1 Análises microbiológicas

O mel adicionado na bebida fermentada à base de extrato de soja foi analisado pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL - do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos de Campinas/SP com relação à presença de esporos de bactérias mesófilas anaeróbicas, em triplicata, para assegurar a qualidade da bebida quanto à presença de bactérias do gênero *Clostridium*, principalmente pertencentes à espécie de *Clostridium botulinum*.

Nesse estudo, o mel foi enviado para análise em Laboratório externo. Entretanto, essa análise é de alto custo, inviabilizando que esta seja a forma mais viável de garantir a segurança do produto, caso seja o interesse de uma possível produção comercial das bebidas. Dessa forma, determinou-se que somente as bebidas adicionadas de mel após a fermentação seriam analisadas sensorialmente, para garantir a qualidade higiênico-sanitária das mesmas devido ao baixo pH, conforme já foi explicado anteriormente.

Foram realizadas análises microbiológicas na matéria-prima extrato de soja e em todas as bebidas fermentadas prontas, a fim de assegurar a qualidade microbiológica das mesmas para a análise sensorial. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR/UFMG) segundo as recomendações da 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 foram as seguintes: contagem de coliformes a 45°C ou termotolerantes, de acordo com o método da American Public Health Association – APHA - (2001); detecção de *Salmonella sp.*, utilizando-se o método da Internacional Organization for Standardization – ISO – nº 6579 (2007); e, contagem de *B. cereus* de acordo com a metodologia proposta pela APHA (2001).

3.3.2 Análises físico-químicas

As determinações de cinzas, umidade, proteínas e lipídeos da matéria prima extrato de soja em pó foram feitas de acordo com os métodos oficiais da AOAC (1995) e realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite na Escola de Veterinária da UFMG.

3.4 Desenvolvimento das bebidas fermentadas

3.4.1 Contagem e padronização dos inóculos de *L.acidophilus* e *L.casei*

Para a elaboração das bebidas fermentadas a base de soja, foi realizada a contagem das células viáveis dos envelopes dos microrganismos liofilizados, fornecidos pela Christian Hansen®, de acordo com a metodologia proposta por Vinderola e Reinheimer (2000) e modificada por Mondragón-Bernal (2004). Para isto, os envelopes foram abertos em condições assépticas e, em seguida, foi pesado 1g de cada cultura liofilizada na câmara de fluxo laminar e adicionados em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de EHS a 6%. Os frascos foram agitados durante 20 minutos para uma boa homogeneização dos inóculos e, depois, adicionados em frascos Ependorf de 1 mL para serem congelados e mantidos em estoque a - 20°C.

Antes do congelamento, o volume de 1 ml de cada suspensão celular foi submetido a diluições seriadas e uma alíquota de 0,1 ml do inóculo foi plaqueada para a contagem de células microbianas, em meio ágar MRS pela técnica de semeadura em superfície, em triplicata. Essas placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em condições de microaerofilia.

3.4.2 Tratamento térmico do mel de abelha

O mel de abelha foi submetido a tratamento térmico a 78°C por 6 minutos em banho-maria, antes de ser adicionado às formulações, a fim de se eliminar os possíveis patógenos existentes (GONNET et al., 1964).

3.4.3 Formulação das bebidas fermentadas

Foram desenvolvidas 18 bebidas fermentadas à base de EHS de acordo com os planejamentos mostrados nas tabelas 2 e 3, a seguir.

As bebidas foram preparadas com a adição de mel antes da fermentação (TABELA 2) e com adição de mel após a fermentação (TABELA 3). Presume-se que o mel de abelha possa exercer efeito prebiótico sobre a microbiota colônica intestinal, por conter uma série de oligossacarídeos, compostos reconhecidos como prebióticos (MACEDO, 2007). Assim, sua adição antes da fermentação teve o objetivo de verificar seu efeito no crescimento e viabilidade dos microrganismos durante a fermentação. Já a adição do mel de abelha após a fermentação, teve como objetivo proporcionar um sabor mais agradável nas bebidas e verificar sua influência na viabilidade das linhagens probióticas durante a vida de prateleira.

Nos ensaios em que se adicionou o mel antes da fermentação as concentrações utilizadas foram de 3 e 5% m/v, conforme recomendação da literatura. Segundo vários autores, abaixo de 3% o mel não exerce o efeito pretendido de auxiliar no crescimento dos micro-organismos probióticos não diminuindo o tempo de fermentação e, acima de 5%, o mel inibe o desenvolvimento dos mesmos (CURDA e PLOCKOVA, 1995; CHICK et al., 2001; KAJIWARA et al., 2002; MACEDO et al., 2008).

O inóculo utilizado foi de 2% m/v quando se fermentou com cultura pura e de 1% m/v de cada espécie quando se utilizou culturas mistas. Os meios de fermentação foram incubados em BOD a 37°C até se atingir o pH de, aproximadamente, 4,4. Meios controles, ou seja, sem a adição do mel, foram fermentados a fim de se comparar o efeito do mel na viabilidade dos micro-organismos probióticos, no tempo de fermentação até atingir a faixa de pH desejável e no teor de ácido láctico produzido.

TABELA 2 – Formulação das bebidas fermentadas a base de EHS a 6% com a adição de mel antes da fermentação.

Amostra	EHS (%)	Inóculo (%)	Mel (%)	Incubação (°C)
<i>L.casei</i>				
A	6	2	0	37
B	6	2	3	37
C	6	2	5	37
<i>L.acidophilus</i>				
D	6	2	0	37
E	6	2	3	37
F	6	2	5	37
Mistura de <i>L.acidophilus</i> e <i>L.casei</i>				
G	6	1 + 1	0	37
H	6	1 + 1	3	37
I	6	1 + 1	5	37

TABELA 3 – Formulação das bebidas fermentadas a base de EHS a 6% com a adição de mel após a fermentação.

Amostra	EHS (%)	Inóculo (%)	Mel (%)	Incubação (°C)
<i>L.casei</i>				
A	6	2	0	37
B	6	2	3	37
C	6	2	5	37
<i>L.acidophilus</i>				
D	6	2	0	37
E	6	2	3	37
F	6	2	5	37
Mistura de <i>L.acidophilus</i> e <i>L.casei</i>				
G	6	1 + 1	0	37
H	6	1 + 1	3	37

O inóculo de 2% foi utilizado devido à metodologia de referência já existente no laboratório para desenvolvimento de bebidas fermentadas e também foram realizados pré-testes que resultaram em números satisfatórios de contagens microbiológicas utilizando-se essa porcentagem de inóculo. Já a temperatura de incubação de 37°C está de acordo com o trabalho desenvolvido por Mondragón-Bernal (2004), onde se verificou que nessa temperatura houve um melhor crescimento microbiano dos micro-organismos *L.acidophilus*, *L.paracasei* e a *Bifidobacterium longum* em extrato hidrossolúvel de soja.

3.4.4 Processo fermentativo

A produção das bebidas fermentadas à base de soja foi realizada conforme metodologia adaptada de Mondragón-Bernal (2004) (FIGURA 2). A reconstituição da matéria-prima foi feita a partir de 6% de extrato de soja em pó em água destilada, agitando moderadamente; depois, a solução foi esterilizada a 121°C por 15 minutos e, logo após, resfriada a 42°C. O mel de abelha foi previamente pasteurizado e adicionado nas concentrações de 3 e 5%, antes da fermentação e após a fermentação. Em seguida, a suspensão contendo as linhagens puras probióticas a 2% m/v e mistas (1% m/v de cada) foi inoculada na bebida representando uma contagem inicial de células de, aproximadamente, 9,42 log UFC/mL de *L.casei* e 9,14 log UFC/mL de *L.acidophilus*. A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio de fermentação, os quais foram incubados em estufa BOD, a 37°C até o pH do meio atingir valores entre 4,3 e 4,5. Em seguida, as amostras fermentadas foram resfriadas e armazenadas em geladeira a 7°C.

Para a análise sensorial e a etapa de vida de prateleira foi adicionada no final da fermentação a base mascarante (1mL para 1L de bebida) e a emulsão sabor mel (1mL para 1L de bebida) para produtos à base de soja, conforme recomendação do fabricante (LACTOSOJA), a fim de que as bebidas fossem sensorialmente mais aceitas pelos provadores.

3.4.5 Fluxograma de produção das bebidas fermentadas

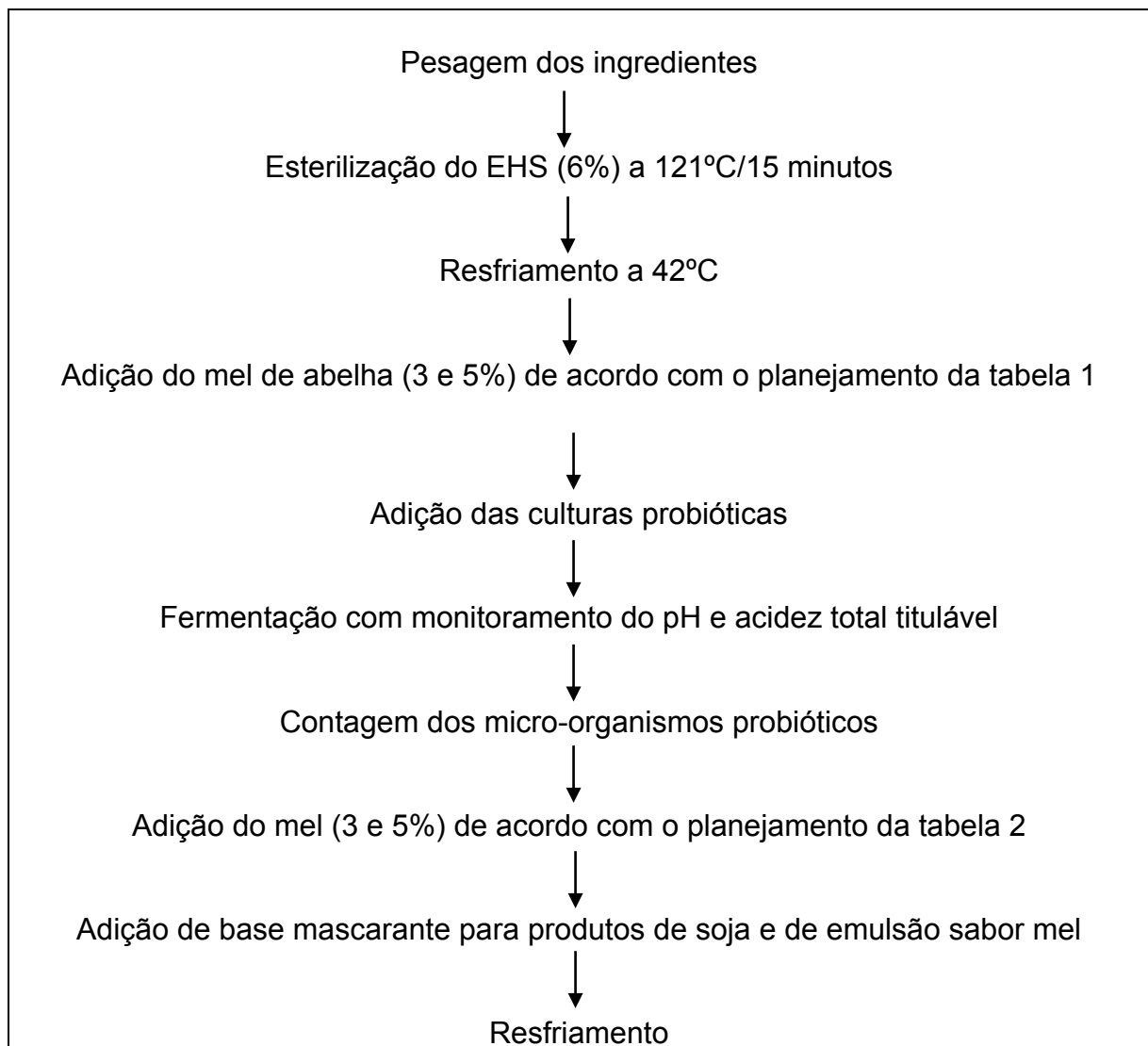


FIGURA 2 - Fluxograma da produção das bebidas fermentadas à base de EHS.

3.4.6 Monitoramento do processo fermentativo das bebidas à base de EHS

Para o acompanhamento da fermentação, alíquotas de cada amostra foram retiradas no tempo inicial e em intervalos de 2h em 2h para a determinação da acidez total titulável e do pH (BEHRENS, 2002). Com estes dados foram construídas as curvas de acidez e pH em função do tempo. A acidez titulável, expressa como

porcentagem de ácido láctico, foi determinada segundo procedimento descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – na Instrução Normativa nº 68 12/12/2006. O pH das amostras foi determinado por medida direta, utilizando-se um potenciômetro (TECNOPON - modelo MPA210), conforme as normas estabelecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) até faixa de pH 4,3 a 4,5. Ao final da fermentação, quando as bebidas atingiram pH próximo a 4,4, foram realizadas as contagens de células probióticas presentes nas bebidas fermentadas de acordo com metodologia de Mondragón-Bernal (2009). Para a contagem de células probióticas, alíquotas de 1 mL das amostras das bebidas fermentadas foram transferidas para tubos com 9 mL de água peptonada (0,1%), a partir dessa diluição foram feitas diluições seriadas. Das diluições selecionadas foram realizados os plaqueamentos em profundidade (pour plate) em meio ágar MRS, em triplicata. As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em microaerofilia e, em seguida, foram realizadas as contagens das colônias nas placas (MONDRAGÓN-BERNAL, 2009).

A produtividade em ácido láctico foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade (g/ L. h)} = \frac{\text{ácido láctico formado (g/L)}}{\text{Tempo (h)}}$$

A acidez produzida (% de ácido láctico) durante o processo fermentativo das bebidas fermentadas foi calculada através da subtração do valor da acidez final sobre o valor da acidez inicial.

$$\text{Acidez produzida (\% ácido láctico)} = \Delta \text{ acidez final} - \text{acidez inicial}$$

3. 5 Análise sensorial das bebidas fermentadas

3.5.1 Público alvo

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial e Estudos de Consumidor (LASEC) da Faculdade de Farmácia da UFMG e tiveram como público alvo: estudantes, professores e funcionários de diversas áreas. O recrutamento dos participantes ocorreu por meio de convite divulgado na comunidade da FAFAR/UFMG, sendo extensivo a todos, acima de 16 anos de idade, desde que não apresentassem aversão a produtos à base de soja e mel de

abelha e não possuísse nenhuma restrição de saúde que os impossibilitasse o consumo desses alimentos (APÊNDICE B)

3.5.2 Testes de aceitação e intenção de compra

Foram realizados testes de aceitação e intenção de compra de nove bebidas fermentadas a base de extrato hidrossolúvel de soja, que correspondem às amostras de bebidas nas quais o mel foi adicionado após a fermentação (TABELA 3), para garantirmos a qualidade higiênico-sanitária das mesmas devido ao baixo pH, conforme já foi explicado anteriormente.

Para a realização da análise sensorial deste estudo, o projeto foi submetido e devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEPE/UFMG), conforme pode ser visto no apêndice I.

As nove amostras foram analisadas sensorialmente em três sessões distintas, sendo três amostras por sessão, distribuídas da seguinte forma:

1ª sessão: bebidas fermentadas com o *L.acidophilus*

- A: Bebida com 0% de mel
- B: Bebida com 3% de mel
- C: Bebida com 5% de mel

2ª sessão: bebidas fermentadas com *L.casei*

- D: Bebida com 0% de mel
- E: Bebida com 3% de mel
- F: Bebida com 5% de mel

3ª sessão: bebidas fermentadas com *L.acidophilus* e *L.casei*

- G: Bebida com 0% de mel
- H: Bebida com 3% de mel
- I: Bebida com 5% de mel

Em cada sessão, foi selecionada a bebida que apresentou maior aceitação para ser determinada na próxima etapa do trabalho a vida de prateleira destas bebidas e das bebidas sem mel.

Foram recrutados, no total, 306 provadores não treinados, consumidores ou não de bebidas à base de soja, totalizando 102 provadores por sessão. Os provadores das diferentes sessões não necessariamente foram os mesmos, pois as sessões eram independentes. Foi adotado o delineamento de blocos completos casualizados. As amostras foram servidas à temperatura de refrigeração, em recipientes descartáveis, brancos, codificados com algarismos aleatórios de três dígitos. Foram apresentadas aos provadores de forma monádica e avaliadas quanto à aceitação (aparência, aroma, sabor e consistência) e à intenção de compra (MACFIE et al., 1989), de acordo com a metodologia sensorial tradicional (teste cego – ausência de informações a respeito da amostra). Antes da avaliação todos os provadores foram informados sobre os procedimentos do teste aplicado, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE C), em duas vias, preencheram ao questionário socioeconômico (APÊNDICE D) e seguiram para as cabines individuais para a realização da análise sensorial. Água e torrada levemente salgada ficaram à disposição dos provadores para enxágue e mastigação entre as amostras, visando limpar a cavidade bucal entre as amostras.



(A)



(B)

FIGURA 3 – Fotografias da realização da análise sensorial (A e B).

Na avaliação da aceitação foi empregada a escala hedônica não estruturada de 7 centímetros (cm) a qual o ponto âncora inferior correspondia a “desgostei muitíssimo” e o ponto âncora superior a “gostei muitíssimo” (APÊNDICE E). Os provadores marcaram na escala de sete centímetros com um traço vertical onde melhor se encaixava sua opinião com relação a cada característica sensorial,

além da impressão global (FERREIRA et al., 2000). Amostras com médias de notas entre 4,51 e 8,00 foram consideradas dentro da faixa de aceitação, enquanto que médias entre 1,00 a 4,50 englobaram a faixa de rejeição (DUTCOSKY, 2007).

Com o auxílio de uma régua foram medidas as notas atribuídas a cada característica sensorial de cada amostra. Posicionou-se a régua fazendo com que o ponto âncora inferior correspondesse a 1 e o ponto âncora superior correspondesse a 8.

Já na avaliação da intenção de compra foi utilizada uma escala de atitude nominal de 5 pontos, no qual o ponto âncora inferior correspondia a “certamente não compraria”, o ponto central a “talvez comprasse, talvez não comprasse” e o ponto âncora superior a “certamente compraria” (MEILGAARD et al., 2007) (APÊNDICE E).

Os resultados dos testes de aceitação foram submetidos à análise de variância (ANOVA com $\alpha = 0,05$) considerando as amostras e os julgadores como causas de variação. Quando a ANOVA era significativa ($\alpha = 0,05$) as médias eram submetidas ao Teste de Comparação de Médias de Tukey ($p \leq 0,05$) para observar qual média era diferente de qual (FERREIRA et al., 2000).

O Índice de Aceitabilidade foi obtido por meio do cálculo da porcentagem das notas das amostras atribuídas a cada característica sensorial da amostra em relação à sua nota sensorial máxima (8,00). Uma amostra é considerada bem aceita quando apresenta Índice de Aceitabilidade maior ou igual a 70%.

Foram desenvolvidos histogramas de frequências para as características sensoriais analisadas (aparência, aroma, sabor, consistência, impressão global), juntamente com a intenção de compra de cada sessão de análise sensorial. Esses histogramas tiveram o objetivo de complementar os resultados da ANOVA e, ainda, de verificar a homogeneidade do comportamento dos provadores, já que as médias encontradas poderiam ser ou não representativas da realidade. Foram criados, no total, dezoito histogramas, através da ordenação crescente das notas dos provadores para cada amostra e para cada característica sensorial. Em seguida, foi obtido o percentual de provadores referente a cada nota atribuída sendo que as amostras se enquadraram na região de aceitação ou na região de rejeição.

3.6 Estudo da vida de prateleira das bebidas

Após terem sido definidas as três bebidas que apresentaram maior aceitação pela análise sensorial, ou seja, a melhor aceita em cada sessão, as mesmas foram armazenadas em BOD à temperatura de 5°C e avaliadas juntamente com seus respectivos controles quanto à vida de prateleira (FIGURA 4). Amostras das bebidas fermentadas foram coletadas nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias e analisadas quanto a: pH, acidez total titulável e contagem dos micro-organismos probióticos, segundo metodologia modificada (EVANGELISTA, 2011).



(A)



(B)



(C)

FIGURA 4 – Fotografias das bebidas armazenadas na BOD durante os testes de vida de prateleira (figuras A, B e C).

3.6.1 Delineamento experimental da vida de prateleira

O delineamento experimental dos testes de vida de prateleira foi através de blocos casualizados, em parcelas subdivididas, conforme metodologia de Gomes (2009) apresentada na tabela 4 (APÊNDICE F).

3.6.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos e viabilidade das culturas probióticas das bebidas fermentadas durante a vida de prateleira

3.6.2.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado por medida direta, utilizando-se um potenciômetro, conforme citado anteriormente no item 3.4.6.

3.6.2.2 Acidez total titulável (ATT)

A acidez foi expressa em porcentagem de ácido láctico e determinada segundo o método oficial da Instrução Normativa do MAPA nº 68 de 12/12/06, conforme citada no item 3.4.6.

3.6.2.3 Quantificação total de células probióticas

As contagens das células probióticas presentes nas bebidas fermentadas foram realizadas segundo metodologia de Mondragón-Bernal (2009), já citada anteriormente no item 3.4.6.

3.7 Análises estatísticas dos resultados

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA com $\alpha = 0,05$). Os resultados de cada determinação foram comparados pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NAS BEBIDAS FERMENTADAS

Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas das matérias primas, como o extrato de soja, de três diferentes lotes de produção, e mel de abelha, de lote único, a fim de garantirmos a qualidade higiênico-sanitária das bebidas que foram desenvolvidas.

4.1.1 Extrato de soja em pó

Foram realizadas análises em três diferentes lotes de extrato de soja visto que, de acordo com o delineamento experimental da pesquisa, esse foi o número

determinado da amostragem, a fim de que os resultados da análise de vida de prateleira encontrados fossem estatisticamente significativos.

Os resultados apresentados na tabela 5 mostram que os extratos de soja utilizados para a obtenção das bebidas fermentadas apresentaram ausência destes micro-organismos, confirmando sua boa qualidade microbiológica e estando de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos e exigidos pela legislação brasileira, segundo as recomendações da Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001).

TABELA 5 – Análises microbiológicas da matéria prima extrato de soja de três diferentes lotes.

Extrato de soja	Micro-organismo/ Limite máximo (UFC/g) ¹		
	<i>Bacillus cereus</i> / g	Coliformes/ g	<i>Salmonella sp</i> / 25g
	5 x 10²	10	Ausente
Lote A	<10 ²	<10	Ausente
Lote B	<10 ²	<10	Ausente
Lote C	<10 ²	<10	Ausente

(¹): UFC: unidade formadora de colônia (BRASIL, 2001).

Benedetti e Falcão (2003), em seu estudo onde o objetivo era monitorar a qualidade higiênico-sanitária do processamento do EHS da UNISOJA de Araraquara/SP, através da determinação da população de coliformes totais e fecais a 45°C e *E.coli*, verificou que, em uma amostragem de dez EHS pasteurizados e dez EHS pasteurizados e refrigerados por 12 horas, foram detectadas as médias de 9,5 e 0,13 NMP/mL de coliformes totais e fecais e de 12,29 e 0,2 NMP/mL de coliformes totais e fecais, respectivamente. Ambos apresentaram ausência de *E.coli*. Assim, de acordo com a legislação atual (ANVISA, 2001), verificou-se que o EHS estava de acordo com os padrões microbiológicos no que diz respeito a coliformes fecais (45°C), entretanto, a maioria das amostras apresentou coliformes totais, apesar da análise não ser exigida pela ANVISA.

O extrato de soja foi utilizado na concentração de 6% de m/v devido à recomendação indicada no rótulo do produto pelo próprio fabricante (OLVEBRA), conforme pode ser visto no apêndice A. Evangelista (2011) em seu estudo sobre a fermentação e vida de prateleira de uma bebida simbiótica à base de soja, avaliando o comportamento de diferentes variáveis nos processos, como concentração de

extrato de soja, temperatura, culturas probióticas, adição de fruto-oligossacarídeos (FOS), dentre outros, relata que, quanto maior a concentração do extrato de soja utilizado para o desenvolvimento das bebidas, maior será a contagem de células ao final da fermentação. A soja possui uma variedade de substratos como sacarose, estaquiose, rafinose, glicose e frutose que são utilizados pelos micro-organismos, apresentando uma maior variedade em relação ao leite de vaca (CHAMPAGNE et al., 2005). Entretanto, Kopper (2009) ao estudar bebidas à base de extrato de soja fermentadas por *L.acidophilus*, utilizou diferentes concentrações do mesmo (8, 10 e 12%), adicionadas de farinha de Bociúva (5%) e observou que quando avaliadas sensorialmente, a bebida que obteve melhor aceitação pelos provadores foi a desenvolvida com menor teor de extrato, provavelmente devido ao menor gosto residual advindo da soja, sugerindo uma possível relação entre menor quantidade de extrato de soja e maior aprovação pelos avaliadores.

A partir desses estudos e, seguindo a indicação do fabricante do extrato foi feito um pré-teste para produção da bebida utilizando a concentração de 6% m/v de EHS. Observou-se que houve um bom crescimento de todos os micro-organismos utilizados (*L.acidophilus* e *L.casei*) resultando em contagens acima de 1×10^8 UFC/mL, como o exigido pela ANVISA (2008) para ser considerada probiótica. Então, padronizou-se a concentração de EHS de 6% m/v para ser utilizada em todos os testes.

Os resultados das análises físico-químicas dos extratos de soja juntamente com os valores apresentados no rótulo do produto e, ainda, os valores máximos e mínimos de umidade e proteínas, respectivamente, preconizados pela legislação (ANVISA 2000, 2005) se encontram na tabela a seguir.

TABELA 6 – Análises físico-químicas da matéria prima extrato de soja.

Análises físico-químicas dos extratos de soja					
Análises	Lote A (%)	Lote B (%)	Lote C (%)	Rótulo fabricante (%)	Legislação (ANVISA) (%)
Umidade	3,5	3,4	3,5	Máximo 4,5	Máximo 6 ⁽¹⁾
Cinzas	6,3	6,3	6,3	Máximo 6	-
Proteínas	46,5	46,4	46,6	44	Mínimo 40 ⁽²⁾
Lipídeos	12,2	12,4	12,1	26	-

(¹): Fonte: ANVISA (2000); (²): Fonte: ANVISA (2005). Valores médios dos diferentes lotes.

Verifica-se (tabela 6) que os EHS utilizados para o desenvolvimento das bebidas fermentadas se encontram de acordo com a legislação para “alimentos com soja”, em relação à umidade e proteína, entretanto os valores encontrados não foram iguais aos indicados no rótulo do produto pelo fabricante. Essa diferença pode ser explicada pelos diferentes métodos utilizados na análise de composição centesimal de alimentos.

4.1.2 Mel de abelha

Conforme pode se verificar na Tabela 7 e apêndice G, em nenhuma das amostras analisadas foram encontradas esporos de bactérias mesófilas anaeróbicas.

TABELA 7 – Análise de esporos de bactérias mesófilas anaeróbicas da matéria prima “mel de abelha”.

Mel de abelha	Micro-organismo
	Esporos de bactérias mesófilas anaeróbicas¹
Amostra A	Ausente
Amostra B	Ausente
Amostra C	Ausente

(¹): Análises realizadas em triplicata.

Referências de trabalhos a partir do ano de 1978 em todo o mundo elucidam que vários estudos vieram sendo realizados a fim de verificar a presença

de esporos de *C. botulinum* em mel e, diferentemente deste trabalho que resultou em ausência de esporos em todas as amostras, grande parte dos autores encontrou esporos nos méis analisados (SUGIYAMA et al., 1978; MIDURA et al., 1979; FARRIS et al., 1981; KAUTTER et al., 1982; CENTORBI et al., 1994; CRISEO et al., 1994; DELMAS et al., 1994; RALL et al., 2001; RAGAZANI et al., 2008). Sugiyama et al. (1978) ao analisarem 241 amostras de mel nos Estados Unidos, verificaram a presença de esporos de *C. botulinum* em 18 amostras, o que corresponde, aproximadamente, 7,5% das amostras analisadas. No trabalho de Midura et al. (1979), das 90 amostras de mel analisadas, foram encontradas esporos de *C. botulinum* em 9 delas, ou seja, 10% das amostras. Dentre essas, 6 amostras que foram consumidas por bebês ocasionaram nos mesmos o desenvolvimento da doença.

Corroborando o presente estudo Delmas et al. (1994) avaliaram 116 amostras de mel na França e nenhuma delas foi positiva para *C. botulinum*. Da mesma forma, a pesquisa realizada por Rall et al. (2001) avaliaram amostras de mel comercializadas em São Paulo e todas apresentaram ausência de esporos de *C. botulinum*.

O trabalho de Ragazani et al. (2008) é o mais recente encontrado. Estes autores avaliaram a qualidade microbiológica do mel comercializado em seis estados brasileiros (São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Ceará, Minas Gerais e Santa Catarina) com relação à presença de esporos de *C. botulinum*. Os mesmos encontraram, em 61% das amostras (n = 100) a presença de bactérias esporuladas, sendo 39% bactérias sulfito-redutoras (11% do gênero *Clostridium* e 28% do gênero *Bacillus*). Dentre os 11% isolados de Clostrídios, em 7% das amostras foram confirmadas a presença do *C. botulinum*.

As concentrações de mel de abelha utilizadas no presente trabalho nas bebidas foram de 3 e 5% p/v. Na maioria dos trabalhos consultados na literatura, foi verificado que, acima de 5% o mel inibe o desenvolvimento dos micro-organismos atuando como antimicrobiano e, abaixo de 3%, o mel não exerce o efeito desejado de auxiliar no desenvolvimento dos micro-organismos e diminuir o tempo de fermentação das bebidas (CURDA e PLOCKOVA, 1995; CHICK et al., 2001; KAJIWARA et al., 2002; MACEDO et al., 2008).

O mel de abelha é também considerado um alimento funcional que exerce a atividade de prebiótico e desempenha diversos efeitos benéficos à saúde, como a

regulação do trânsito intestinal, a regulação da pressão arterial, a redução dos riscos de câncer e dos níveis de colesterol, dentre outros (ANJO, 2004). Assim, sugere-se também que o mel possa exercer efeito prebiótico sobre a população de lactobacilos e bifidobactérias do cólon, por conter uma série de oligossacarídeos (LEITE et al., 2000) podendo estimular o crescimento, atividade e viabilidade das bactérias probióticas (MACEDO, 2007) apesar de também apresentar propriedades antimicrobianas inerentes que limitam a sobrevivência e o desenvolvimento da grande maioria dos micro-organismos (ANJO, 2004).

Além disso, por ser composto por, aproximadamente, 83% de carboidratos, sendo eles, em sua maioria, fermentáveis como a frutose, glicose, sacarose, maltose e oligossacarídeos (RACOWSKI et al., 2007) contribuem para acelerar o metabolismo dos micro-organismos propiciando uma maior produção de ácido e, conseqüentemente, um abaixamento mais eficaz do pH, ou seja, um processo fermentativo mais rápido que o usual (MACEDO, 2008).

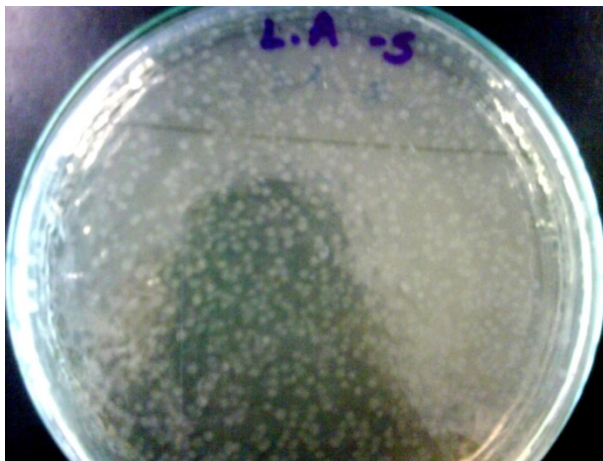
4.2 CONTAGEM E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

A padronização do inóculo foi realizada pela contagem de colônias sendo os resultados expressos em log UFC/ mL. Os resultados da concentração de micro-organismos presentes nos envelopes das culturas e suas características macro e microscópicas encontram-se na tabela 8.

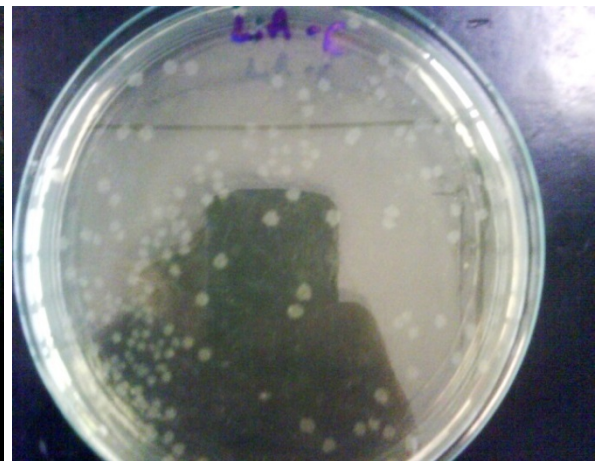
TABELA 8 - Média e desvio padrão das contagens do inóculo em número de células viáveis dos micro-organismos probióticos (Christian Hansen®).

Espécie	Contagem (log UFC/g) ¹	Características ²
<i>L.acidophilus</i>	9,14 ± 0,17	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Microscopicamente</u>: bastonetes gram positivos; médios a longos. • <u>Macroscopicamente</u>: colônias “transparentes” com bordas irregulares.
<i>L.casei</i>	9,42 ± 0,13	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Microscopicamente</u>: bastonetes gram positivos; mais finos e menores do que <i>L.acidophilus</i>. • <u>Macroscopicamente</u>: colônias brancas, leitosas e com bordas regulares.

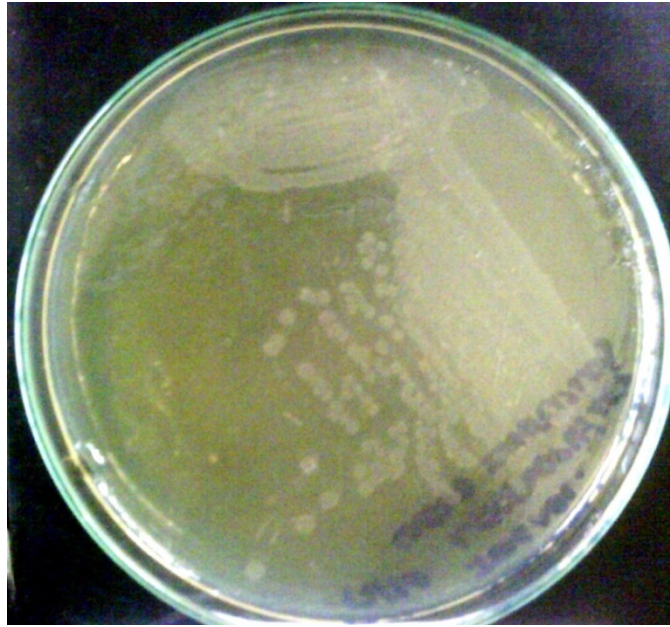
(¹): Análises em triplicata. (²): As características macroscópicas das colônias podem ser observadas nas Figuras 5 e 6.



(A)

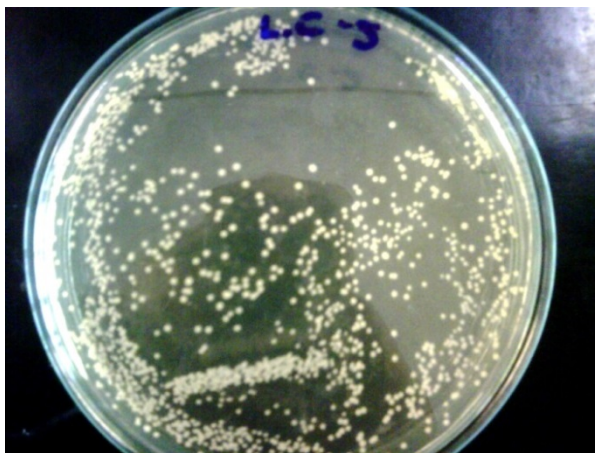


(B)

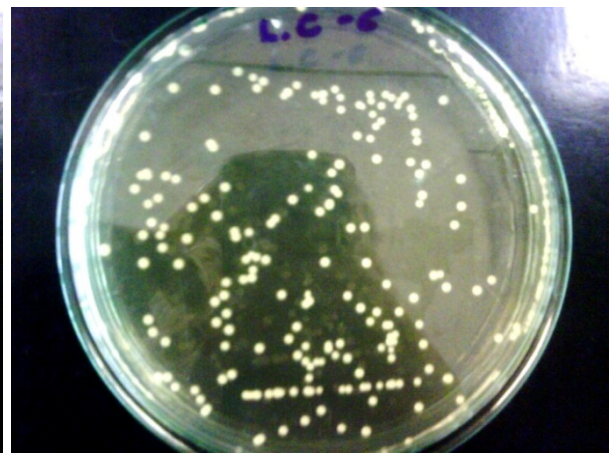


(C)

FIGURA 5 – Fotografias das placas de contagem (A e B) e de isolamento/ purificação (C) do *L. acidophilus* em meio MRS. (A) *L. acidophilus* na diluição 10^{-5} , (B) *L. acidophilus* na diluição 10^{-6} , (C) Isolamento e purificação de *L. acidophilus*.



(A)



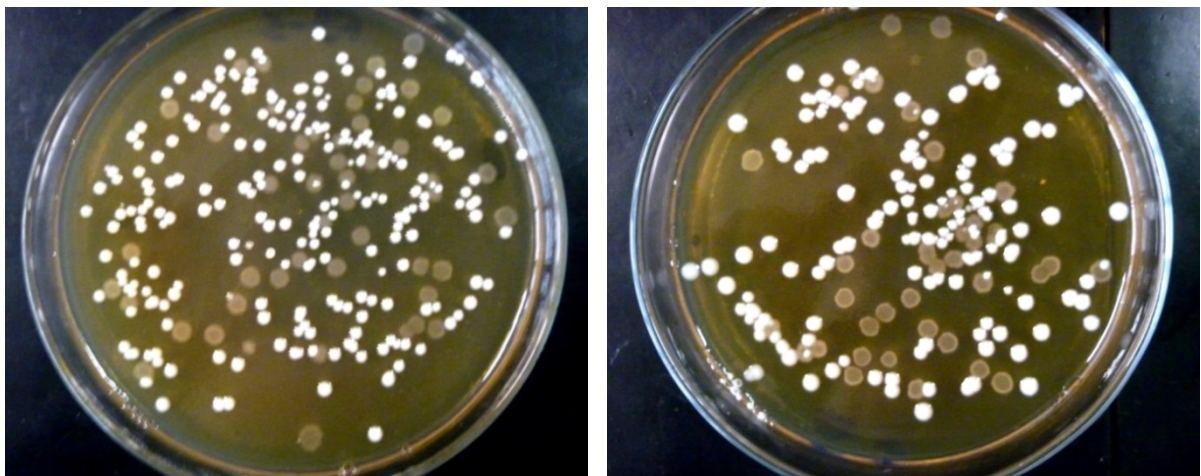
(B)



(C)

FIGURA 6 – Fotografias das placas de contagem (A e B) e de isolamento/purificação (C) do *L. casei* em meio MRS. (A) *L. casei* na diluição 10^{-5} , (B) *L. casei* na diluição 10^{-6} , (C) Isolamento e purificação de *L. casei*.

As diferenças morfológicas das colônias permitiu realizar a contagem diferenciada entre as espécies quando os dois micro-organismos eram inoculados no mesmo meio, tal como pode ser observado na figura 7.



(A)

(B)

FIGURA 7 – Fotografias das placas de contagem (A e B) das bebidas inoculadas com *L. casei* e *L. acidophilus* em meio MRS. (A) *L. casei* e *L. acidophilus* na diluição 10^{-5} , (B) *L. casei* e *L. acidophilus* na diluição 10^{-6} .

4.3 FERMENTAÇÃO DO EHS

A fermentação foi conduzida até que o pH chegasse na faixa de 4,2 a 4,4. Estes valores foram escolhidos, visto que, se a fermentação for finalizada em pH abaixo de 4,2, a bebida ficaria muito ácida e provavelmente teria baixa aceitação na análise sensorial. Por outro lado, se a fermentação for finalizada em pH próximo ou acima de 4,5, o produto será comprometido com relação ao seu sabor por não haver melhoria da qualidade sensorial já que, nesta faixa de pH, ainda não haverá o efeito mascarante dos produtos resultantes da fermentação (ácido láctico, acetaldeído e diacetil) sobre os compostos voláteis do “leite” de soja, como o n-hexanal, que é responsável pelo sabor e aroma característicos nos produtos de soja, de feijão cru, diminuindo assim, a aceitação das bebidas por parte dos provadores (PATEL et al., 1980). Já que a atividade proteolítica desses micro-organismos, em especial do *L. casei*, é responsável pela formação de precursores de aroma e sabor, contribuindo para a eliminação do “off-flavor” causado pelo n-hexanal. Além disso, uma vez que o ponto isoelétrico das proteínas da soja é entre 4,6 a 4,7, é importante alcançar um pH inferior a este valor a fim de se evitar a sinérese no produto final (BRANDÃO, 1995).

Outro fator que foi levado em consideração para finalizar a fermentação na faixa de pH anteriormente citada, foi o de que a germinação dos esporos de *C. botulinum* não ocorre em alimentos com pH abaixo de 4,5. Já em alimento com pH acima de 4,6 ocorre o seu desenvolvimento e a produção de sua toxina. De acordo com uma revisão sobre o assunto realizada por Ito e Chen (1978) foi demonstrado que, embora um pH de 4,5, na maioria dos casos, iniba o crescimento de esporos de *C. botulinum*, o pH mínimo em que o crescimento é inibido em um dado alimento é específico para o mesmo e pode ser mais alto que o valor de 4,6 (PIRES, 2011). Dessa forma, percebe-se que a faixa de pH estipulada para finalizar a fermentação de 4,3 a 4,5 dá a garantia da qualidade microbiológica das bebidas com relação à presença de células viáveis de *C. botulinum*, já que, a alta acidez das bebidas não permite que ocorra a germinação dos esporos evitando desta forma que ocorra a produção das toxinas letais.

A qualidade sensorial das bebidas fermentadas, lácteas ou não, dependem do pH de corte, ou seja, um valor ou faixa de valores de pH designados para o término da fermentação. Dessa forma, o aroma, a consistência, o sabor e a

aparência, dentre outros atributos sensoriais, são influenciados diretamente pelo pH final da bebida (BEHRENS, 2004). O valor do pH final pode variar dependendo da matriz a ser utilizada para a fermentação e do objetivo pretendido para o produto final, dentre outros aspectos.

Outros autores em trabalhos semelhantes também finalizaram a fermentação na faixa de pH entre 4,3 e 4,5. No estudo de Behrens (2002) onde o objetivo era desenvolver bebidas à base de extrato hidrossolúvel de soja do tipo “iogurte para beber”, adicionadas de sacarose e/ou lactose e aromatizadas com diferentes sabores de frutas, a fermentação foi finalizada na faixa de pH de 4,2 a 4,3 pela mesma justificativa do presente trabalho. Da mesma forma, Evangelista (2011) ao estudar a fermentação e a vida-de-prateleira de bebida simbiótica a base de soja, avaliando a influência de diferentes fatores (soja, micro-organismos, temperatura, etc), o processo fermentativo foi encerrado em pH próximo a 5, visto que, nesse valor as bebidas já apresentavam consistência firme. Entretanto, é importante ressaltar que no estudo citado, não houve análise sensorial com as bebidas fermentadas desenvolvidas.

No estudo de Kooper (2009), todas as bebidas simbióticas à base de soja desenvolvidas apresentaram pH menor que 4,6, mais especificamente, 4,4, o que é recomendado sob o ponto de vista tecnológico, já que o ponto isoelétrico das proteínas da soja é em torno de pH 4,6 a 4,7, ou seja, abaixo desses valores vai ocorrer a desnaturação das proteínas solúveis da soja, mudando e favorecendo a consistência e a cor das bebidas devido à formação de um coágulo, modo no qual as proteínas são de mais fácil digestão (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004). Outros trabalhos que também estabeleceram o final do processo fermentativo em pH semelhante à faixa do presente estudo são o de Umbelino et al. (2001), que encerraram a fermentação em pH próximo a 4,46 e o desenvolvido por Rossi et al (1999), que finalizou a fermentação quando as bebidas atingiram pH em torno de 4,4.

De acordo com Antunes (2004), em formulações de bebidas nas quais o pH se encontra pouco abaixo de 4,9, há formação de um gel semelhante ao formado em iogurtes e, ainda, há uma maior estabilidade do produto se a fermentação prosseguir até pH 4,6.

4.3.1 Fermentações sem adição do mel de abelha

4.3.1.1 Curvas de acidez e pH dos ensaios de fermentação

O gráfico abaixo (FIGURA 8) apresenta a variação do pH e acidez em função do tempo, obtidos durante o processo de fermentação das bebidas de EHS adicionadas de 2% do inóculo de *L.acidophilus*, *L.casei* e a mistura do *L.acidophilus* com o *L.casei*, sem adição do mel de abelha.

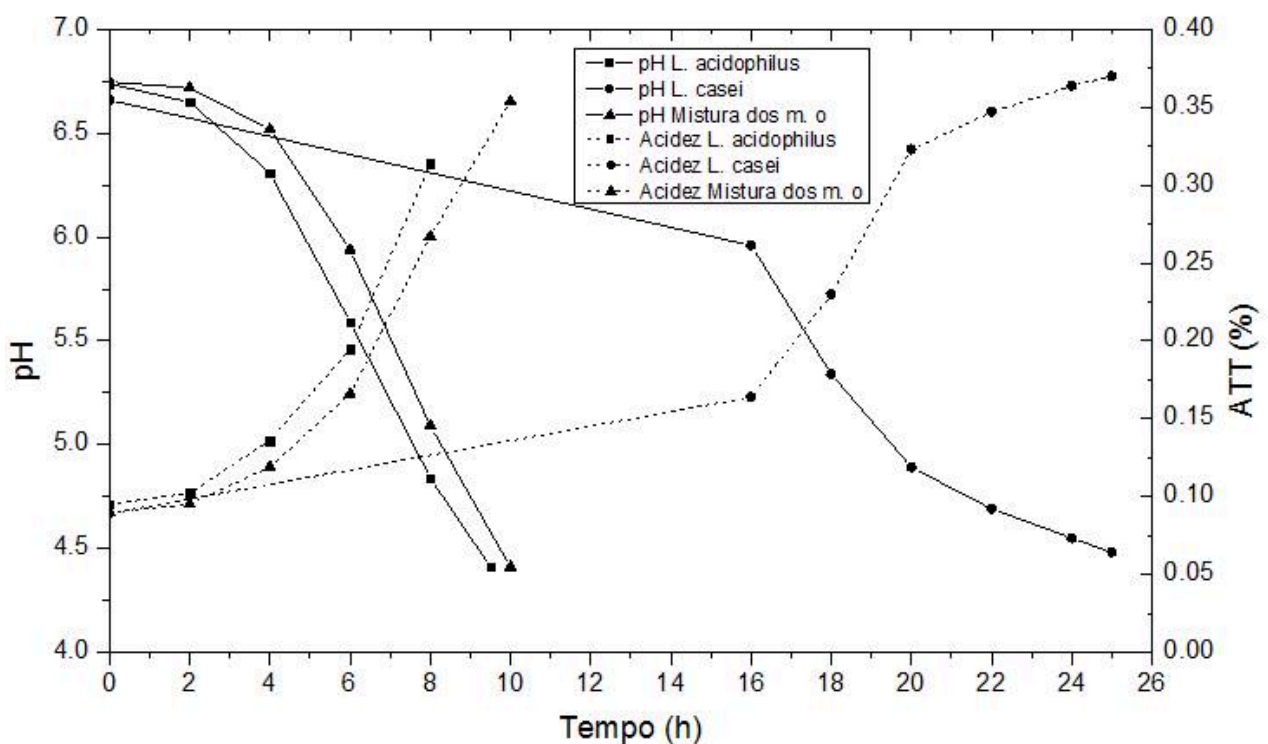


FIGURA 8 – Variação do pH e da acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS inoculado com 2% m/v de *L.acidophilus*, *L.casei* e a mistura das linhagens.

De acordo com as curvas de acidificação mostradas na figura acima, pode-se observar que o *L.acidophilus* foi o micro-organismo que fermentou o EHS em menor tempo, levando apenas 9,5 horas para acidificar a bebida até o pH de, aproximadamente, 4,3. Resultado semelhante foi obtido com a fermentação da mistura dos dois micro-organismos, como cultura mista, o *L.acidophilus* e o *L.casei*, juntos fermentaram o EHS em 10 horas. Já o *L.casei* utilizado como cultura pura para a fermentação, demorou aproximadamente 25 horas para a fermentação.

Estes dados demonstram que o *L.acidophilus*, ao ser utilizado isolado ou em cultura mista, fermenta eficazmente o EHS, sem a suplementação com o mel, levando um tempo bastante inferior ao que o *L.casei* necessita para a fermentação. Uma possível justificativa para esses resultados seria porque as linhagens possuem diferentes sistemas metabólicos, que são intrínsecos de cada cultura, já que as fermentações foram conduzidas nas mesmas condições: inóculo a 2%, temperatura a 37°C e extrato de soja a 6% (m/v).

Uma diferença metabólica entre as cepas é o fato do *L.acidophilus* ser uma bactéria láctica obrigatoriamente homofermentativa, ou seja, que fermenta apenas a glicose e não pentoses ou gliconatos, resultando na produção de ácido láctico no final. Já o *L.casei* por ser facultativamente heterofermentativo onde, diferentemente do *L.acidophilus*, além de fermentar pentoses, fermenta também hexoses em ácido láctico e, ainda, pode produzir gás a partir do gliconato, mas não através da fermentação da glicose (BURITI e SAAD, 2007). Dessa forma, sugere-se que, quando utilizados para a fermentação de forma isolada, cada cepa gasta um tempo diferente por possuir sistema enzimáticos distintos para metabolizar os substratos presentes no EHS. Mas, quando utilizadas juntas fazem com que o tempo gasto para o processo seja bastante reduzido, sendo próximo ao encontrado na fermentação pelo *L.acidophilus* isolado.

Corroborando o presente estudo, tem-se a pesquisa de Mondragón-Bernal (2004) que teve como objetivo estudar o comportamento do crescimento de alguns micro-organismos probióticos em EHS adicionado de oligossacarídeos prebióticos, para a obtenção de uma bebida fermentada simbiótica. O autor verificou que, a linhagem de *Lactobacillus paracasei* que apresenta comportamento fisiológico e necessidade nutricional muito similar ao *L.casei* (FELIS et al., 2001; DESAI et al., 2006) se desenvolveu mais lentamente do que as linhagens de *Bifidobacterium longum* e de *L.acidophilus*. Da mesma forma, no trabalho de Behrens (2002) verificou que o *L.acidophilus* fermentou o EHS em menos tempo do que o *L.casei*.

Comparando o tempo de fermentação em horas gastas por cada cepa no presente estudo com trabalhos semelhantes descritos na literatura, observa-se que Mondragón-Bernal (2004) encontrou um tempo de fermentação do EHS de 12 horas para o *L.acidophilus* e de 24 horas para o *L.paracasei* até atingir pH 4,4. Behrens (2002) verificou tempos de 14 e 16 horas para o *L.acidophilus* e *L.casei*, respectivamente, até fermentarem o EHS ao mesmo valor de pH.

Essa diferença entre os tempos para atingir o pH final desejado pode ser devido a diferenças nas condições de fermentação. De acordo com Mondragón-Bernal (2004) e Evangelista (2011) as principais variáveis que interferem no processo fermentativo são: temperatura de fermentação e quantidade de inóculo. Quanto maior a temperatura e a quantidade de inóculo, menor será o tempo de fermentação.

Os dados da tabela 9 são referentes aos trabalhos citados anteriormente sobre a fermentação do EHS, pelo *L.acidophilus*, entretanto, de forma mais detalhada, a fim de ilustrar a importância das variáveis temperatura e concentração do inóculo inicial no tempo de fermentação do EHS.

TABELA 9 – Variáveis que interferem significativamente no tempo de fermentação (temperatura e inóculo) de trabalhos envolvendo o processo fermentativo do EHS pelo micro-organismo probiótico *L.acidophilus*.

Autor/ ano	Tempo de fermentação (h)	pH final	Temperatura (°C)	Inóculo (log UFC/mL)
Presente estudo	9,5	4,4	37	7,5
Mondragón-Bernal (2004)*	12	4,4	37	7,7
Mondragón-Bernal (2004)*	24	6,1	37	3,7
Behrens (2002)	14	4,4	39	6,0

(*): Estudos realizados pelo mesmo autor/ano, entretanto, com diferentes concentrações de inóculo inicial para verificar o seu efeito no tempo de fermentação.

Conforme se pode observar na Tabela 9, quando se utilizou a mesma temperatura de fermentação (37°C), o maior tempo de fermentação (24 horas) ocorreu quando se utilizou uma menor concentração de células no inóculo (3,7 log UFC/mL), e, o pH final foi de 6,1, enquanto com um inóculo de (7,7 log UFC/mL) o tempo de fermentação foi de apenas 12 horas e o pH final de 4,4.

Kooper (2009) em seu estudo que visava desenvolver uma bebida à base de soja contendo farinha de Bocaiúva (prebióticos) e *L. acidophilus* (probióticos) em simbiose, apesar de ter trabalhado com outras culturas probióticas, verificou que, devido à mesma quantidade de inóculo e à mesma faixa de temperatura utilizada (40 a 45°C), todas as bebidas obtidas apresentaram um tempo de fermentação de aproximadamente 5 horas até atingir pH de 4,4.

4.3.1.2 Acidez total titulável e pH

Com relação à acidez total titulável, observou-se o aumento da mesma em função do tempo resultado que já era esperado devido à produção de ácido láctico (FIGURA 8 e TABELAS 10 e 11 no Apêndice H). Nas bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus* foi encontrada acidez inicial de 0,09% e final de 0,37%. Nas bebidas fermentadas pela mistura das duas culturas a acidez inicial foi de 0,09% e a final de 0,35%. Já nas bebidas fermentadas pelo *L.casei* encontrou-se acidez inicial de 0,09% e final de 0,37%. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos como o realizado por Behrens (2002) que, ao realizar a fermentação de EHS suplementado com 2% m/v de sacarose, pelo *L.casei* e/ou *L.acidophilus*, iniciou as fermentações com pH 6,87 e acidez de 0,11% e pH 6,92 e 0,10%, respectivamente, e finalizou com pH 4,34 e acidez de 0,84% e pH 4,44 e acidez de 0,69%, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados pelo autor ao suplementar os meios com 2% de lactose, ou seja, diminuição do pH com consequente aumento de acidez no decorrer da fermentação.

De modo semelhante, Evangelista (2011) realizou fermentação de EHS nos quais os valores de pH inicial dos meios variaram entre 6,0 e 6,5 e foram diminuindo com o tempo de fermentação e, conseqüentemente, aumentando a acidez, sendo que após 6 horas alguns ensaios chegaram a apresentar pH inferior a 5. O efeito de abaixamento do pH se deve ao fato de que durante a fermentação ocorre o crescimento dos micro-organismos com concomitante consumo de açúcares, tanto da soja como de FOS, e produção de ácidos acético e láctico (DONKOR et al., 2007), causando queda do pH.

De modo parecido com o presente estudo, Kooper (2009) ao verificar a evolução dos parâmetros de acidez e pH durante a fermentação das bebidas à base EHS obtidas, observou que os valores da acidez tiveram um aumento gradativo apresentando-se ao final da fermentação dentro da faixa estabelecida para bebidas lácteas na legislação brasileira, que é de 60 a 150°D (BRASIL, 2005), correspondente a um pH próximo a 4,4.

Da mesma forma, Mondragón-Bernal (2004) verificou em sua pesquisa que durante a fermentação houve um rápido consumo de substratos e geração de metabólitos, basicamente ácidos orgânicos. Com isso, os açúcares presentes no EHS foram consumidos nas primeiras doze horas de fermentação e foram

convertidos em ácidos tituláveis causando a queda do pH. Assim, o pH das bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus* baixou de 6,54 para 4,44 e a acidez aumentou de 0,03% de ácido láctico do início para 0,10% de ácido láctico encontrados ao final. Já as bebidas fermentadas pelo *L.paracasei* tiveram seu pH reduzido de 6,31 para 4,44 e acidez aumentada de 0,03% para 0,13% de ácido láctico.

4.3.2 Fermentações com adição do mel de abelha

4.3.2.1 Curvas de acidez e pH dos ensaios de fermentação

As FIGURAS 9, 10 e 11 são referentes à variação do pH e acidez em função do tempo, obtidos durante o processo de fermentação para obtenção das bebidas de EHS adicionadas de 2% de inóculo de *L.acidophilus*, 2% de *L.casei* e com a mistura do *L.acidophilus* (1%) com o *L.casei* (1%), respectivamente, sem (0% de mel) e com a adição do mel de abelha antes da fermentação nas concentrações de 3 e 5%.

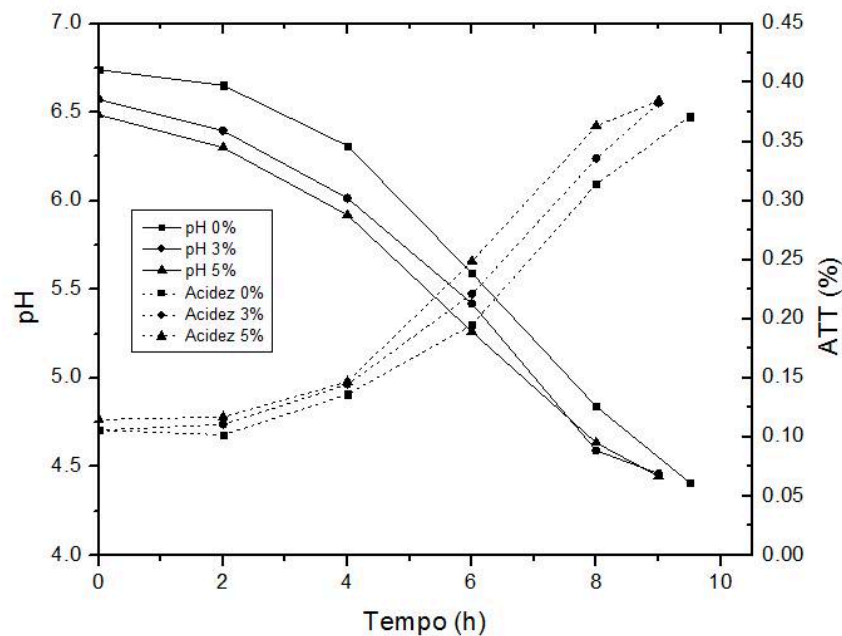


FIGURA 9 – Variação do pH e acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS sem mel (0% mel) e com adição de 3% e 5% de mel antes e inoculado com *L.acidophilus* (2%).

De acordo com a figura 9, observa-se que nas três condições o *L. acidophilus* gastou, aproximadamente, 9 horas para abaixar o pH das bebidas até valor próximo a 4,4.

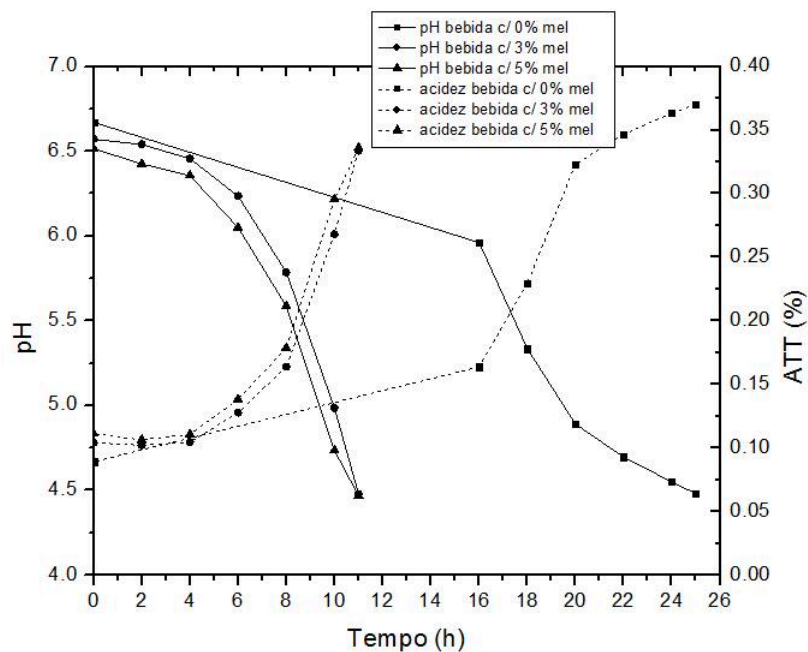


FIGURA 10 – Variação do pH e acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS sem (0% mel) e com adição de 3 e 5% de mel antes e inoculado com *L.casei* (2%).

Nos ensaios de fermentação com *L. casei* (FIGURA 10) verifica-se que o tempo de fermentação foi de aproximadamente 11 horas quando se adicionou 3 e 5% de mel. Já nos ensaios sem a adição de mel o tempo de fermentação foi mais do que o dobro (25 horas).

Analisando a Figura 11, observa-se que quando foi utilizada a cultura mista *L.acidophilus* e *L.casei* o tempo gasto para o pH atingir 4,4, foi de 8,5 horas, semelhante aos experimentos que se utilizaram a cultura pura de *L.acidophilus*. Já sem a adição do mel o tempo foi de 10 horas.

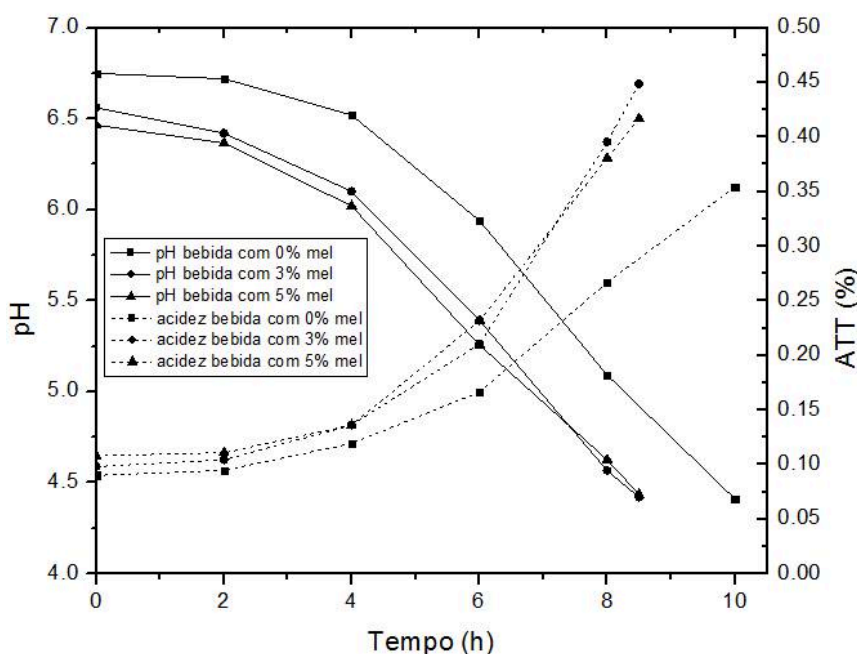


FIGURA 11 – Variação do pH e acidez em função do tempo durante a fermentação do EHS sem (0% mel) e com adição de 3 e 5% de mel antes e inoculado pela mistura do *L.acidophilus* (1%) e *L.casei* (1%).

Analisando as figuras 9, 10 e 11, verifica-se que a adição de mel nas concentrações de 3 ou 5% nos meios de fermentação ocasionou redução do tempo de fermentação em relação aos ensaios sem adição de mel (controle). Esta diminuição no tempo de fermentação pode ser devido ao fato do mel ser composto por, aproximadamente, 83% de carboidratos, sendo eles, em sua maioria, fermentáveis como a frutose, glicose, sacarose, maltose e oligossacarídeos (RACOWSKI et al., 2007) contribuindo para acelerar a produção de ácido e, conseqüentemente, diminuir o tempo de fermentação.

Mondragón-Bernal (2004) observou que os mono e dissacarídeos são os primeiros açúcares a serem consumidos pelos probióticos e que os oligossacarídeos rafinose e estaquiose são hidrolisados parcialmente ao longo da fermentação liberando sacarose e monossacarídeos que servem também como fonte de carbono para os probióticos. Assim, o mel por ser um alimento rico em açúcares, principalmente os simples como os mono e dissacarídeos, quando adicionado no EHS é considerado fonte rica e imediata de carbonos e substrato para os micro-organismos que imediatamente os metabolizam acelerando o processo fermentativo com o aumento da produção de ácidos e diminuição do pH.

Outros autores (EVANGELISTA, 2011; BARBOSA, 2007; BEHRENS, 2002) estudaram a adição de carboidratos como a sacarose, o FOS, a lactose, etc, nos meios constituídos por EHS e concluíram que esses açúcares aceleravam o processo, mas não interferiam significativamente na diminuição do tempo de fermentação.

Uma observação importante de se fazer é que, mesmo nas fermentações do EHS sem a adição de mel, os micro-organismos probióticos fermentaram o extrato de soja.

Segundo vários autores a fermentação do EHS por micro-organismos probióticos é favorecida pela presença de prebióticos no EHS, como os oligossacarídeos, rafinose e estaquiose e a presença de outros fatores bifidogênicos como os outros açúcares sacarose, frutose, glicose, galactose, as vitaminas do complexo B e as fontes de nitrogênio das proteínas da soja, fazem dessa bebida um meio complexo e ótimo substrato para o crescimento destes micro-organismos (CHIARELLO, 2002; CHOU E HOU, 2000; HOU et al., 2000; SCALABRINI et al., 1998; TAMIME et al., 1995).

4.3.2.2 Acidez total titulável e pH

A tabela 12 apresenta os resultados da produtividade em ácido láctico (g. L⁻¹. h⁻¹) obtidas nos ensaios de fermentação.

TABELA 12 – Produtividade em ácido láctico (g. L⁻¹. h⁻¹) obtidas nos ensaios sem e com adição de mel (3 e 5%) fermentadas pelos micro-organismos probióticos *L.acidophilus*, *L.casei* e a mistura das duas cepas.

Produtividade em ácido láctico			
Adição do mel []	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.acidophilus</i> + <i>L.casei</i>
0%	0,0390 ^a	0,0147 ^a	0,0354 ^a
3%	0,0425 ^a	0,0303 ^b	0,0527 ^b
5%	0,0427 ^a	0,0305 ^b	0,0490 ^c

(^{a, b, c}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme os dados mostrados na tabela 12 verifica-se que nos ensaios de fermentação com *L.acidophilus*, houve um pequeno aumento da produtividade em ácido láctico com o aumento da concentração de mel, entretanto esse aumento não foi significativo ($p < 0,05$).

Já nas fermentações com *L.casei*, a adição de 3 e 5% de mel as produtividades foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos ensaios sem adição de mel (controle), mas não houve diferença significativa entre a adição de 3 ou 5% de mel.

Em relação às fermentações com a cultura mista com a adição de 3 e 5% de mel as produtividades foram significativamente maiores do que no controle, no entanto o aumento da concentração de mel de 3 para 5% ocasionou diminuição significativa ($p < 0,05$) na produtividade em ácido láctico. Verifica-se que em todos os ensaios nos quais se adicionou mel houve um aumento significativo na produtividade em ácido láctico, ou seja, o tempo necessário para se atingir um dado valor de ácido láctico diminuiu.

Observa-se na tabela 13 que o pH inicial das bebidas em que não houve adição de mel de abelha, foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os pH das bebidas adicionadas de mel. Observa-se também que, quanto maior a quantidade de mel adicionada, menor foi o pH inicial das mesmas.

TABELA 13 – Potencial hidrogeniônico (pH) inicial e acidez produzida (% de ácido láctico) durante o processo fermentativo nas bebidas à base de EHS adicionadas de mel de abelha nas concentrações de 0, 3 e 5%.

Micro-organismos	[] mel	Bebidas	pH inicial	Acidez produzida (Δ) (% ácido láctico)
<i>L.acidophilus</i>	0%	A	6,74 ^a	0,277 ^a
	3%	B	6,57 ^b	0,276 ^a
	5%	C	6,49 ^c	0,270 ^a
<i>L.casei</i>	0%	D	6,67 ^a	0,281 ^a
	3%	E	6,57 ^b	0,230 ^a
	5%	F	6,52 ^c	0,225 ^a
<i>L.acidophilus</i> + <i>L.casei</i>	0%	G	6,75 ^a	0,2642 ^a
	3%	H	6,56 ^b	0,3486 ^b
	5%	I	6,47 ^c	0,3067 ^c

(^{a, b, c}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A análise estatística foi realizada entre as diferentes linhagens probióticas.

Corroborando tal observação, Macedo (2008) em seu trabalho no qual o objetivo era estudar o efeito do mel sobre o crescimento e a viabilidade de culturas probióticas em leite fermentado durante 46 dias de armazenamento a 7°C, verificou um pH inicial de 4,87 e acidez de 0,69% na bebida a ser fermentada pelo *L.acidophilus* sem adição de mel e um pH de 4,40 e acidez de 0,91% na bebida a ser fermentada pelo mesmo micro-organismo, entretanto, com adição de 3% m/v de mel de abelha. Na bebida controle (sem mel) a ser fermentada pelo *L.casei* observou-se um pH inicial de 5,25 e acidez de 0,54% e um pH de 4,47 e acidez de 0,81% na bebida em que o mel foi adicionado antes do processo fermentativo.

Dessa forma, este autor verificou que os valores de pH das bebidas fermentadas por *L.acidophilus* e *L.casei* com adição de mel, no tempo 0, foram menores do que o pH dos controles, da mesma forma que o encontrado no presente estudo. Isto se deve ao fato dos diferentes tipos de méis existentes serem ácidos, sendo o ácido glucônico, o que é produzido pela enzima glicose-oxidase sobre a glicose, o mais comum entre eles (HORN, 1996).

Verifica-se também na tabela 13 que não houve diferença significativa na acidez produzida nos meios de fermentação quando se utilizou as bactérias *L.*

acidophilus ou *L. casei* entre os meios controles e com adição de mel. No entanto, observa-se diferença significativa nos ensaios sem adição de mel com a cultura mista das duas linhagens ($p < 0,05$).

4.4 VIABILIDADE DAS LINHAGENS PROBIÓTICAS NAS BEBIDAS

Foram realizadas as contagens das bactérias lácticas viáveis antes e após a fermentação das bebidas, ou seja, no tempo inicial (tempo 0) e no tempo final, quando o pH das bebidas atingiu valores entre 4,3 a 4,5. Esta determinação teve como objetivo a verificação do atendimento a legislação brasileira (ANVISA, 2008), isto é se o produto poderia ou não ser considerado probiótico e então dar prosseguimento às próximas etapas de análise microbiológica, análise sensorial e vida de prateleira.

Na tabela 14 são apresentadas as médias das contagens por grupos de culturas probióticas antes e após a fermentação nas bebidas controle (0% de mel) e nas bebidas em que foram adicionadas mel nas concentrações de 3 e 5% antes da fermentação e suas respectivas análises estatísticas.

TABELA 14 – Contagens por grupo de micro-organismos probióticos após fermentação nas bebidas adicionadas (3 e 5%) ou não de mel de abelha.

Adição do mel [%]	Contagens (log UFC/mL)					
	<i>L.acidophilus</i>		<i>L.casei</i>		<i>L.acidophilus</i> + <i>L.casei</i>	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
0%	7,47 ^a	7,76 ^{B,b}	7,73 ^a	9,03 ^{A,b}	7,60 ^a	8,25 ^{A,b}
3%	7,47 ^a	8,87 ^{C,b}	7,73 ^a	9,24 ^{A,b}	7,60 ^a	8,22 ^{A,b}
5%	7,47 ^a	6,50 ^{A,b}	7,73 ^a	9,46 ^{A,b}	7,60 ^a	7,94 ^{A,b}

(^{A, B, C}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

(^{a, b, c}): Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.4.1 Bebidas controle (sem adição de mel de abelha)

Observando os resultados da tabela 14 verifica-se que nas bebidas sem adição de mel (controle) o micro-organismo que apresentou maior crescimento

durante a fermentação foi *L.casei* que aumentou ($p < 0,05$), aproximadamente, 1,3 ciclos log, passando de 7,73 log UFC/mL para 9,03 log UFC/mL durante as 25 horas de fermentação. Já o *L.acidophilus* apresentou o menor crescimento com a diferença de apenas 0,29 ciclo log entre sua contagem inicial e contagem final (7,47 log UFC/mL e 7,76 log UFC/mL, respectivamente). Entretanto, esse aumento é significativo estatisticamente ($p < 0,05$). A cultura mista das duas cepas apresentou crescimento intermediário significativo ($p < 0,05$), havendo um aumento de, aproximadamente, 0,65 ciclo log durante o seu processo fermentativo de 10 horas passando de 7,60 log UFC/mL para 8,25 log UFC/mL de bebida.

Semelhantemente, Mondragón-Bernal (2004) verificou que a cultura pura de *L.paracasei* subsp. *paracasei*, cepa com comportamento fermentativo semelhante ao *L.casei*, apresentou um ótimo crescimento em EHS, atingindo contagens de 10^{12} a 10^{13} log UFC/mL aproximadamente na 20^a a 24^a hora de incubação, momento em que as proteínas da soja foram desnaturadas pela queda do pH. Mondragón-Bernal (2004) verificou também que a cultura pura de *L.acidophilus*, apresentou pouco aumento do número de células em soja observado pela baixa contagem ao final da fermentação, o mesmo foi encontrado no presente estudo.

Com relação ao comportamento do *L.acidophilus*, o mesmo autor verificou que, quando era utilizado um baixo inóculo para fermentar o extrato hidrossolúvel de soja a 37°C, o micro-organismo se desenvolvia melhor (de 3,7 log UFC/mL para 7,1 log UFC/mL) em 24 horas de fermentação, entretanto, durante todo esse tempo, o pH inicial que era de 6,91 só atingiu o valor de 6,17. Quando foi utilizado um inóculo maior para a fermentação, o tempo de fermentação foi menor (12 horas) até se atingir pH 4,4. Entretanto, o crescimento do *L.acidophilus* foi menor, aumentando de 7,70 log UFC/mL para 8,35 log UFC/mL de bebida, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo.

Mondragón-Bernal (2004) sugere que quando se utiliza inóculo com altas concentrações de células de *L.acidophilus*, os micro-organismos consomem com bastante eficácia os substratos ali presentes, ocorrendo uma queda ainda mais rápida do pH, ou seja, um aumento da acidez devido à geração de metabólitos ácidos, o que causa com o tempo uma leve inibição do crescimento celular, uma suposta autólise (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004).

4.4.2 Bebidas com adição de mel de abelha

Ao compararmos as médias das contagens finais dos micro-organismos nas bebidas fermentadas com mel de abelha pelo *L.casei* (TABELA 14), verifica-se que não há diferença significativa entre elas. De forma semelhante, a adição de mel nas bebidas fermentadas pela cultura mista das duas culturas probióticas não interferiu de forma significativa em suas viabilidades quando comparadas com a bebida controle, sem adição de mel.

Diferentemente dos resultados expostos anteriormente, as contagens de células das três diferentes bebidas fermentadas por *L.acidophilus* apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre si, ou seja, a adição de 3% de mel ocasionou aumento de, aproximadamente, um log na contagem final de células. Isso se deve, provavelmente, ao fato do mel ser um alimento rico em açúcares e fonte de carboidratos fermentáveis (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004), contribuindo para acelerar o metabolismo (MACEDO, 2008) e, supostamente também, o crescimento e desenvolvimento microbiano quando adicionado nesta concentração.

Entretanto, a adição de 5% de mel, interferiu de forma negativa diminuindo em, aproximadamente, um log na contagem de *L.acidophilus* quando comparado com a bebida controle em que não houve adição de mel. Resultado semelhante ao encontrado por Curda e Plockova (1995) que avaliaram o efeito do mel adicionado em concentrações de 0,1,3,5 e 10% no leite de vaca e verificou que o *L.acidophilus* foi inibido nas bebidas em que foi adicionado em concentrações acima de 5%.

Uma possível explicação para o resultado encontrado é que o mel atue de forma semelhante ao fruto oligossacarídeo (FOS) já que o mel é um alimento que contém naturalmente oligossacarídeos em sua composição (LEITE et al., 2000; ANJO, 2004). Os oligossacarídeos são parcialmente hidrolisados durante a fermentação liberando lentamente sacarose e monossacarídeos que acabam por servir como fonte de carbonos para os micro-organismos fermentadores (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004).

Em estudos em que o FOS foi adicionado em diferentes concentrações, com o objetivo de atuar como prebiótico auxiliando o desenvolvimento e manutenção da viabilidade dos micro-organismos probióticos, os autores encontraram que o alto teor de açúcares presentes no FOS causa um incremento da pressão osmótica, que somado à grande quantidade de inóculo e substrato acaba resultando em uma

rápida queda de pH, causando com o tempo uma inibição das culturas presentes nas bebidas, atuando como um antimicrobiano. Estes autores concluíram que o FOS apresentou um efeito negativo sobre a contagem total final de células (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004; EVANGELISTA, 2011).

Já em outras pesquisas, como a realizada por Chick et al. (2001) a adição de mel em leite de vaca não foi inibitória para as culturas. Nesse estudo, o objetivo foi avaliar a influência do mel e de outros açúcares quanto à acidez e viabilidade de quatro culturas: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrukeii* subsp. *bulgaricus* e *Bifidobacterium bifidum*. O leite foi suplementado com 5% de mel, 5% de frutose e 5% de sacarose, separadamente. Como resultado, a adição de 5% de mel não foi inibitória para as culturas. Além disso, todas as culturas permaneceram viáveis durante 14 dias, e ainda, a produção de ácido láctico pela *B.bifidum* foi significativamente maior na presença de mel em relação aos outros açúcares.

Assim, percebe-se que deve existir um balanço ideal de carboidratos presentes no meio para que não exista a inibição e consequente prejuízo do crescimento dos probióticos durante a fermentação e a vida de prateleira, visto que um excesso de açúcares eleva a pressão osmótica e acelera o metabolismo microbiano causando a queda brusca do pH pela conversão de açúcares a ácidos orgânicos (EVANGELISTA, 2011).

Para produzir suas ações benéficas, os alimentos probióticos devem ser consumidos diariamente. A recomendação atual, de acordo com a ANVISA (2008), é baseada na ingestão diária de 8 log a 9 log UFC/dia de micro-organismos viáveis. Como a porção diária de leite fermentado é estabelecida em 200 mL de acordo com a ANVISA (2003), verifica-se que, em cada mL de bebida fermentada se deve ter, no mínimo, 10^6 UFC ou 6 log UFC de culturas probióticas para o produto ser considerado funcional. Dessa forma, conclui-se que todas as bebidas fermentadas desenvolvidas neste trabalho apresentaram a concentração de células viáveis de acordo com o número mínimo exigido pela legislação e podem ser consideradas probióticas.

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS FERMENTADAS

De acordo com os resultados mostrados nas tabelas 15 e 16, todas as bebidas analisadas apresentaram ausência dos micro-organismos pesquisados. Todas as bebidas estão de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos e exigidos pela legislação brasileira, segundo as recomendações da Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) podendo ser encaminhadas seguramente para a próxima etapa de análise sensorial.

TABELA 15 – Análises microbiológicas das bebidas fermentadas à base EHS adicionadas de mel de abelha antes da fermentação.

Bebidas	Micro-organismo/ Limite máximo (UFC/)		
	<i>Bacillus cereus/ g</i>	<i>Coliformes/ g</i>	<i>Salmonella sp/ 25g</i>
	5×10^2	10	Ausente
A	$<10^2$	<10	Ausente
B	$<10^2$	<10	Ausente
C	$<10^2$	<10	Ausente
D	$<10^2$	<10	Ausente
E	$<10^2$	<10	Ausente
F	$<10^2$	<10	Ausente
G	$<10^2$	<10	Ausente
H	$<10^2$	<10	Ausente
I	$<10^2$	<10	Ausente

A: Bebida fermentada pelo *L.acidophilus* sem adição de mel; **B:** Bebida fermentada pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel; **C:** Bebida fermentada pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel; **D:** Bebida fermentada pelo *L.casei* sem adição de mel; **E:** Bebida fermentada pelo *L.casei* com adição de 3% de mel; **F:** Bebida fermentada pelo *L.casei* com adição de 5% de mel; **G:** Bebida fermentada pela mistura das linhagens sem adição de mel; **H:** Bebida fermentada pela mistura das linhagens com adição de 3% de mel; **I:** Bebida fermentada pela mistura das linhagens com adição de 5% de mel

TABELA 16 – Análises microbiológicas das bebidas fermentadas à base EHS adicionadas de mel de abelha depois da fermentação.

Bebidas	Micro-organismo/ Limite máximo (UFC/)		
	<i>Bacillus cereus/ s/g</i>	<i>Coliformes/ g</i>	<i>Salmonella sp/ 25g</i>
	5×10^2	10	Ausente
A'	$<10^2$	<10	Ausente
B'	$<10^2$	<10	Ausente
C'	$<10^2$	<10	Ausente
D'	$<10^2$	<10	Ausente
E'	$<10^2$	<10	Ausente
F'	$<10^2$	<10	Ausente
G'	$<10^2$	<10	Ausente
H'	$<10^2$	<10	Ausente
I'	$<10^2$	<10	Ausente

A': Bebida fermentada pelo *L.acidophilus* sem adição de mel; **B':** Bebida fermentada pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel; **C':** Bebida fermentada pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel; **D':** Bebida fermentada pelo *L.casei* sem adição de mel; **E':** Bebida fermentada pelo *L.casei* com adição de 3% de mel; **F':** Bebida fermentada pelo *L.casei* com adição de 5% de mel; **G':** Bebida

fermentada pela mistura das linhagens sem adição de mel; **H'**: Bebida fermentada pela mistura das linhagens com adição de 3% de mel; **I'**: Bebida fermentada pela mistura das linhagens com adição de 5% de mel.

4.6 ANÁLISE SENSORIAL DAS BEBIDAS FERMENTADAS

Das dezoito bebidas desenvolvidas e analisadas microbiologicamente - correspondentes às nove bebidas com adição do mel antes e depois da fermentação, respectivamente – apenas as bebidas em que o mel foi adicionado após o processo fermentativo foram enviadas para a análise sensorial, mesmo tendo sido todas consideradas seguras microbiologicamente, conforme resultados apresentados anteriormente. A escolha desse grupo de bebidas foi baseada em alguns aspectos microbiológicos, sendo o principal, relacionados à adição do mel caso haja um futuro interesse em reprodução comercial das bebidas.

Os provadores recrutados para o teste de aceitação e intenção de compra eram, em sua maioria, do sexo feminino (84%), com idade entre 16 e 25 anos (80%), estudantes da UFMG com ensino superior incompleto (76%). Quase a metade dos colaboradores da pesquisa (45%) apresentou renda familiar entre 5 e 9 salários mínimos (TABELA 17).

TABELA 17 - Caracterização sócio-econômica dos participantes dos testes de aceitação e intenção de compra de bebidas fermentadas à base de EHS.

VARIÁVEIS SÓCIO-ECONÔMICAS	%
Gênero	
Feminino	84
Masculino	16
Faixa etária (anos)	
16 – 25	80
26 – 35	15
36 – 45	2
46 – 55	2
56 – 65	1
Escolaridade	
Ensino Médio Completo	3
Ensino Superior Incompleto	76
Ensino Superior Completo	3
Pós-graduação: Especialização	1
Pós-graduação: Mestrado/Doutorado	17
Renda Familiar Mensal (salários mínimos)	
1 a 4	34
> 5 a 9	45
> 10 a 19	15
> 20 a 29	5
≥ 30	1

EHS: extrato hidrossolúvel de soja.

Ao analisarmos os relatos dos provadores em relação a já ter experiência anterior com bebidas à base de soja, quase a totalidade dos participantes da pesquisa (89%) afirmou já ter experimentado este tipo de produto. Entretanto, ao serem questionados do quanto gostam ou desgostam de bebidas à base de soja, grande parte dos participantes disse gostar moderadamente (42%), conforme figuras 12 e 13 abaixo.

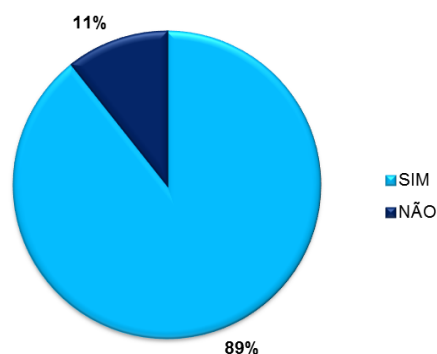


FIGURA 12 – Percentual (%) de consumidores que disseram já ter ou não experimentado bebidas à base de soja anteriormente ao teste de aceitação e intenção de compra.

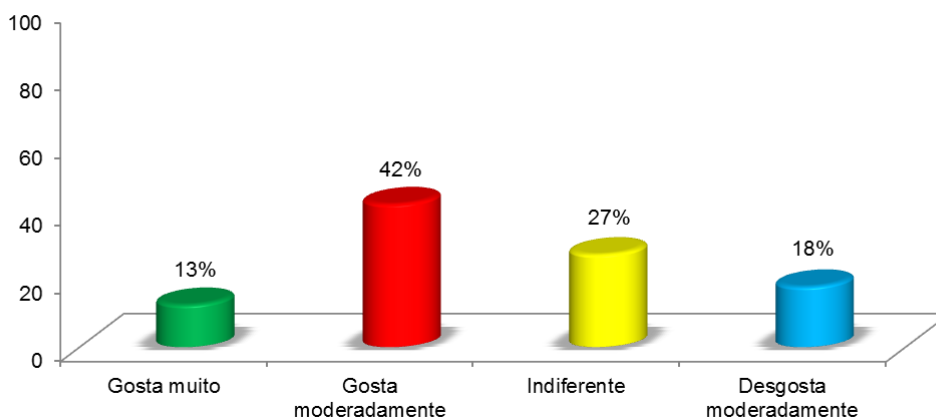


FIGURA 13 – Percentual (%) de consumidores que relataram o quanto gostam ou desgostam de bebidas à base de soja.

Behrens (2002) em seu estudo verificou a atitude de consumidores com relação a alimentos à base de soja e derivados (proteína de soja, “leite” de soja, “iogurte” de soja, tofu e soja em grãos) de 100 indivíduos considerados consumidores desses produtos. Assim como no presente estudo, o autor constatou que o consumo desses alimentos é apreciado por poucos indivíduos, tendo encontrado uma média de apenas 3% dos consumidores relatando “gostar muito”, 12% “não gostar nem desgostar” e 3% “desgostar moderadamente” de produtos à base de soja.

Ao avaliar a frequência de consumo de bebidas à base de soja neste trabalho, a grande maioria (78%) relatou consumir estes produtos raramente (40%) e eventualmente (38%), conforme figura 14 abaixo.

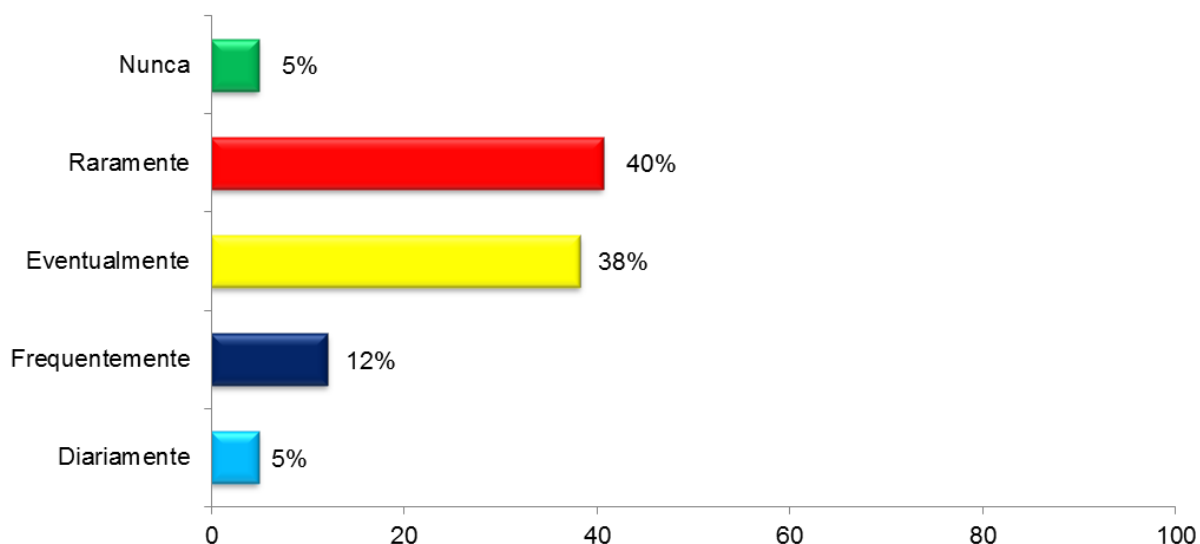


FIGURA 14 – Frequência de consumo (%) de bebidas à base de soja pelos consumidores.

Ainda no estudo de Behrens (2002), assim como nesta pesquisa, poucos (aproximadamente 3%) foram os entrevistados que reportaram consumir os produtos à base de soja com frequência, apesar de a pesquisa ter sido realizada com “consumidores” destes produtos, de acordo com o autor. A proteína, o “leite” de soja e, em menor escala, o tofu, foram os alimentos citados mais vezes pelos entrevistados. Cerca de 30% deles responderam consumir esses alimentos, pelo menos, uma vez por mês. Por outro lado, o “iogurte” de soja e a soja em grãos foram produtos praticamente relatados como nunca consumidos pelos mesmos. O autor verificou que 40% e 70% nunca experimentaram “leite” de soja e “iogurte” de soja, respectivamente. Verificou-se ainda que, aproximadamente, 8% dos indivíduos disseram consumir “leite” de soja com frequência igual ou superior a uma vez por semana. O maior relato de consumo de proteína de soja pelos entrevistados poderia ser justificado pelo fato da maioria ser estudantes ou funcionários da UNICAMP e que, por isso, geralmente realizam as suas refeições no restaurante universitário, que serve diariamente como opção de fonte proteica, a proteína de soja, tornando-a mais conhecida por estes indivíduos (BEHRENS, 2002).

Por meio da análise dos dados do presente estudo, percebe-se que embora o Brasil seja um dos maiores produtores mundiais de soja, a presença deste alimento ou derivados no hábito do consumidor brasileiro é bastante pequena (BEHRENS, 2002). Este resultado pode estar associado ao fato de grande parte dos

brasileiros ainda desconhecer a qualidade nutricional da soja e os diversos benefícios que ela proporciona à saúde dos indivíduos, como a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (HASLER, 1998), uma vez que Behrens (2002), em seu trabalho, evidenciou a falta de informações dos entrevistados sobre vantagens e benefícios do consumo regular da soja e seus produtos na dieta diária.

Verifica-se um potencial de expansão de mercado destes produtos a partir da elaboração de novos alimentos a base de soja por se tratar de consumidores de um país considerado um dos maiores produtores do alimento e, ainda, por ter sido verificado a falta de conhecimento da existência de uma variedade de outros produtos à base de soja além do tradicional “leite” de soja aromatizado ou não. Para isso, faz-se necessário pensar em diferentes estratégias tecnológicas para o desenvolvimento de produtos mais agradáveis sensorialmente a fim de que venham apresentar boa aceitação pelos consumidores aumentando assim a sua frequência de consumo e, conseqüentemente, auxiliando na melhora da saúde da população, por se tratar de alimentos funcionais comprovados cientificamente por exercerem diversos benefícios à saúde.

Além disso, é interessante investir na divulgação dos benefícios do consumo de produtos à base de soja e de probióticos à saúde humana, a fim de levantar expectativas positivas nos consumidores e estimular a compra e consumo destes produtos (BEHRENS, 2002).

Nas tabelas 18, 19 e 20 a seguir estão apresentadas as médias de cada característica sensorial (aparência, aroma, sabor, consistência) e também da impressão global avaliada pelo painel sensorial, de acordo com a sessão realizada (1ª, 2ª ou 3ª) das nove bebidas fermentadas à base de EHS com adição do mel de abelha após a fermentação utilizando uma escala de sete centímetros, além do teste de intenção de compra, utilizando uma escala de cinco pontos.

TABELA 18 - Média das notas de aceitação da 1ª sessão em relação à aparência, aroma, sabor, consistência, impressão global e das notas de intenção de compra das amostras de bebidas à base de soja adicionadas de mel após o processo fermentativo pelo *L.acidophilus*.

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Consistência	Impressão global	Intenção de compra
A	4,62 ^a	4,19 ^a	2,11 ^c	4,29 ^{a,b}	2,83 ^b	1,72 ^b
B	4,54 ^a	4,12 ^a	2,49 ^b	3,93 ^b	2,97 ^b	1,83 ^b
C	4,56 ^a	4,29 ^a	2,96 ^a	4,55 ^a	3,38 ^a	2,13 ^a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Amostra A: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* sem adição de mel;

Amostra B: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel;

Amostra C: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel.

Teste de aceitação: escala hedônica não estruturada de 7 cm onde o ponto âncora inferior corresponde a “desgostei muitíssimo” e o ponto âncora superior corresponde a “gostei muitíssimo”.

Teste de intenção de compra: escala de atitude estruturada de 5 pontos onde o ponto 1 corresponde a “certamente não compraria”; 2 a “possivelmente não compraria”; 3 a “talvez comprasse, talvez não comprasse”; 4 a “possivelmente compraria”; e, por fim, 5 a “certamente compraria”.

De acordo com os resultados acima, verificou-se que não houve diferença significativa entre as amostras A, B e C quanto à aparência e ao aroma. Entretanto, analisando os valores médios das duas características, as amostras foram aceitas sensorialmente pelos provadores com relação à aparência por terem obtido médias na faixa de aceitação (entre 4,51 e 8,00), enquanto que, com relação ao aroma, as mesmas foram rejeitadas sensorialmente pelos provadores por terem apresentado médias na faixa de rejeição (entre 1,00 e 4,50). Corroborando esses dados, têm-se os histogramas das figuras 15 e 16 a seguir.

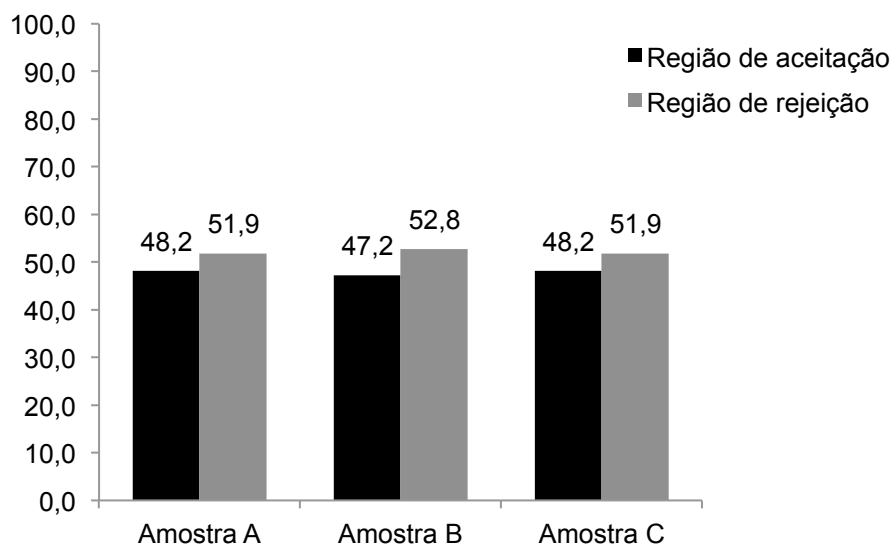


FIGURA 15 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (*L.acidophilus*) em relação à característica sensorial “aparência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra A: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* sem adição de mel;

Amostra B: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel;

Amostra C: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel.

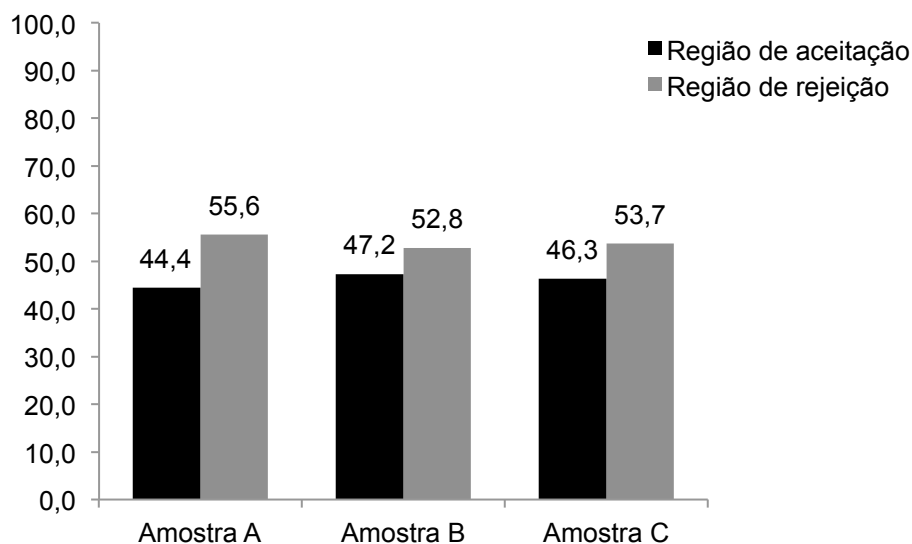


FIGURA 16 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (*L.acidophilus*) em relação à característica sensorial “aroma” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra A: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* sem adição de mel;

Amostra B: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel;

Amostra C: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel.

A partir das figuras, verificou-se que não houve grande variação das médias entre as amostras A, B e C e os percentuais de aceitação e de rejeição foram parecidos com ligeira tendência para a faixa de rejeição. Por isso, as médias não foram consideradas significativas a 5% e os histogramas estão reproduzindo com eficácia os resultados das médias obtidas.

Com relação ao sabor houve diferença significativa a 5% entre as três amostras, entretanto, todas elas foram rejeitadas sensorialmente, sendo que a rejeição foi menor para a amostra C, seguida da amostra B e, finalmente, da amostra A (TABELA 18). Dessa forma verificou-se que a adição de mel influenciou positivamente no sabor. Uma hipótese para tal fato é que os açúcares presentes no mel podem ter mascarado, em partes, a acidez das bebidas fermentadas. Entretanto, as médias mantiveram-se baixas, sinalizando que o sabor das bebidas deve ser melhorado.

Da mesma forma, na característica sensorial “impressão global” e na “intenção de compra” os consumidores rejeitaram menos a amostra C quando comparado com as amostras A e B, ou seja, a amostra que continha a maior concentração de mel. Novamente esses resultados sugerem que a adição de mel auxiliou na menor rejeição das bebidas pelos consumidores. Os histogramas abaixo corroboram tais resultados.

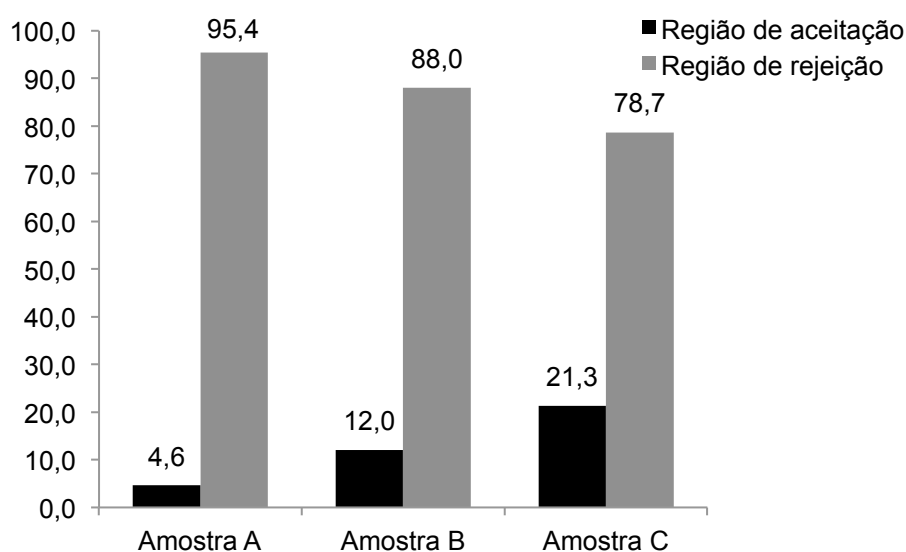


FIGURA 17 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (*L.acidophilus*) em relação à característica sensorial “sabor” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra A: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* sem adição de mel;
Amostra B: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel;
Amostra C: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel.

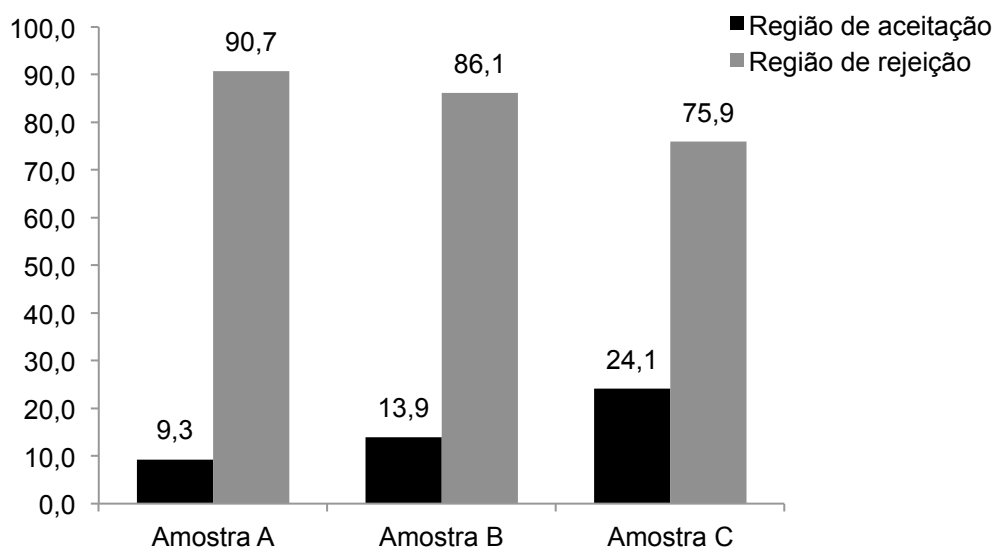


FIGURA 18 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (*L.acidophilus*) em relação à característica sensorial “impressão global” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra A: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* sem adição de mel;
Amostra B: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel;
Amostra C: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel.

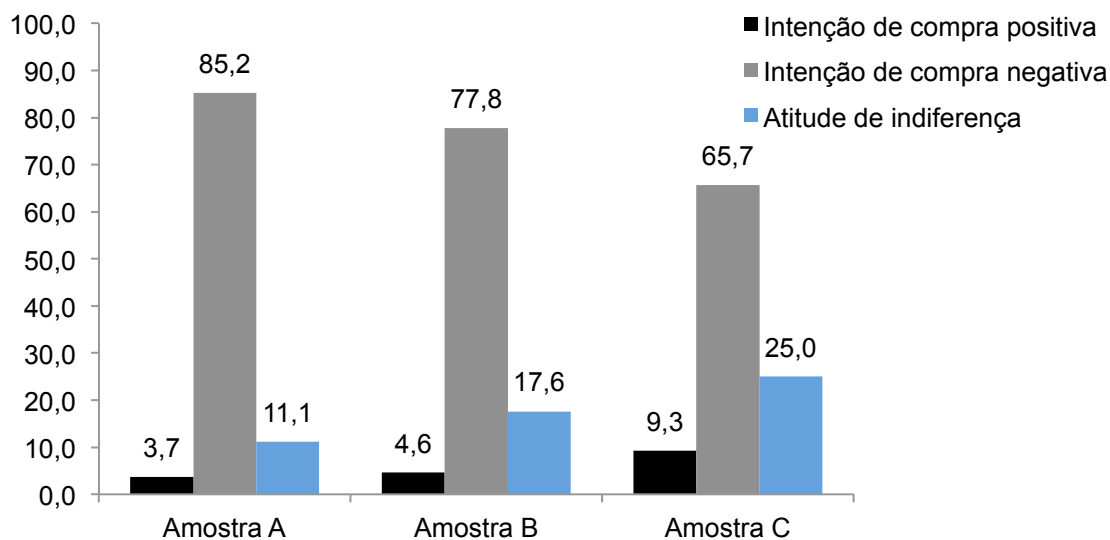


FIGURA 19 – Porcentagens de intenção de compra positiva ou negativa ou atitude de indiferença pela avaliação das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (*L.acidophilus*) em relação ao teste de intenção de compra das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Intenção de compra positiva: notas 4 e 5. Intenção de compra negativa: notas 1 e 2. Atitude de indiferença: nota 3.

Amostra A: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* sem adição de mel;

Amostra B: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel;

Amostra C: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel.

De acordo com os histogramas de frequência para “sabor”, “impressão global” e “intenção de compra”, todas as amostras se encontraram na faixa de rejeição, entretanto, a adição de mel influenciou de forma positiva na opinião dos provadores, pois as médias foram aumentando de acordo com a concentração de mel adicionada. É possível também perceber que os provadores foram coerentes em suas notas apresentando um comportamento homogêneo durante a avaliação sensorial das amostras. E, ainda, verifica-se que para os provadores em questão a característica sensorial “sabor” é determinante na avaliação sensorial da impressão global e na intenção de compra dessas bebidas. Assim é fundamental a melhoria do sabor destes produtos a fim de aumentar a aceitação pelos consumidores.

E, por fim, na média de notas da característica sensorial “consistência” foi possível verificar uma diferença significativa a 5% entre as amostras C e B, mas não entre as amostras A e B e entre as amostras A e C (TABELA 18) o que pode ser demonstrado no histograma de frequência a seguir.

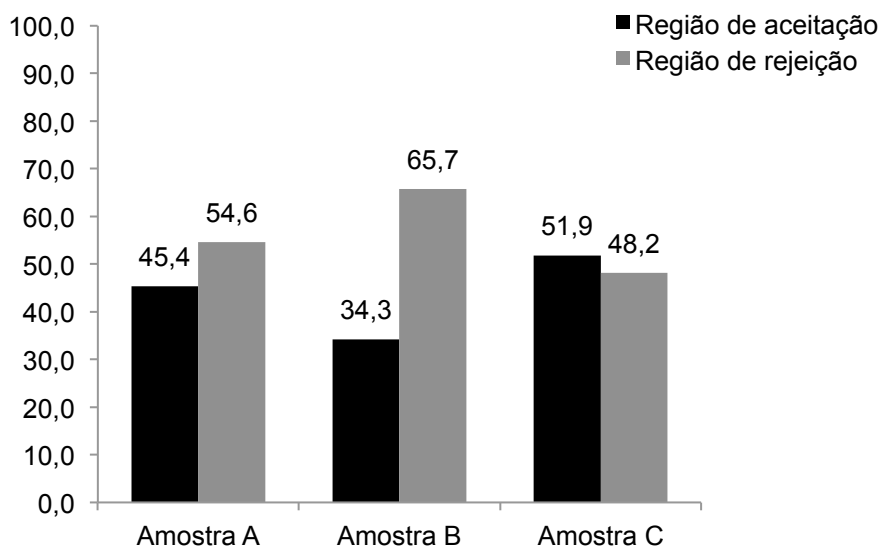


FIGURA 20 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 1ª sessão (*L.acidophilus*) em relação à característica sensorial “consistência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra A: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* sem adição de mel;

Amostra B: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 3% de mel;

Amostra C: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel.

A bebida fermentada à base de soja pelo *L.acidophilus* com adição de 5% de mel após a fermentação - bebida C - foi considerada a bebida mais bem aceita sensorialmente dentre as bebidas da 1ª sessão, sendo então, a designada para prosseguir para a etapa de vida de prateleira deste estudo, juntamente com o seu controle sem adição de mel (bebida A com 0% de mel).

Na tabela 19 abaixo, encontram-se os resultados das médias das notas de aceitação da 2ª sessão da análise sensorial das mesmas características avaliados na primeira sessão das bebidas à base de soja adicionadas de mel após a fermentação pelo *L.casei*.

TABELA 19 - Média das notas de aceitação da 2ª sessão em relação à aparência, aroma, sabor, consistência, impressão global e das notas de intenção de compra das amostras de bebidas à base de soja adicionadas de mel após o processo fermentativo pelo *L.casei*.

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Consistência	Impressão global	Intenção de compra
D	5,33 ^a	3,96 ^b	2,51 ^c	4,76 ^a	2,95 ^c	1,74 ^c
E	5,36 ^a	4,50 ^a	3,07 ^b	4,86 ^a	3,43 ^b	1,99 ^b
F	4,99 ^b	4,09 ^b	3,69 ^a	4,66 ^a	3,86 ^a	2,36 ^a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Amostra D: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* sem adição de mel;

Amostra E: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra F: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel.

Teste de aceitação: escala hedônica não estruturada de 7 cm onde o ponto âncora inferior corresponde a “desgostei muitíssimo” e o ponto âncora superior corresponde a “gostei muitíssimo”.

Teste de intenção de compra: escala hedônica estruturada de 5 pontos onde o ponto 1 corresponde a “certamente não compraria”; 2 a “possivelmente não compraria”; 3 a “talvez comprasse, talvez não comprasse”; 4 a “possivelmente compraria”; e, por fim, 5 a “certamente compraria”.

É verificado que as bebidas obtidas pela fermentação pelos diferentes micro-organismos apresentaram características diferentes sendo que o *L.casei*, de uma maneira geral, apresentou médias maiores do que o *L.acidophilus*.

Analisando os dados da tabela acima, na média de notas da característica sensorial “aparência” foi possível verificar uma diferença significativa a 5% entre as amostras D e E com a amostra F e, também, uma diferença significativa a 5% entre as amostras D e F com a amostra E nas médias de notas da característica sensorial “aroma”.

Os valores médios dessas duas características indicaram, novamente, como na sessão anterior, que as amostras foram aceitas sensorialmente pelos provadores com relação à “aparência”, entretanto, rejeitadas com relação ao “aroma”, por terem obtido médias na faixa de aceitação (entre 4,51 e 8,00) e na faixa de rejeição (entre 1,00 e 4,50), respectivamente, o que pode ser visualizado nos histogramas de frequência das figuras 21 e 22 a seguir.

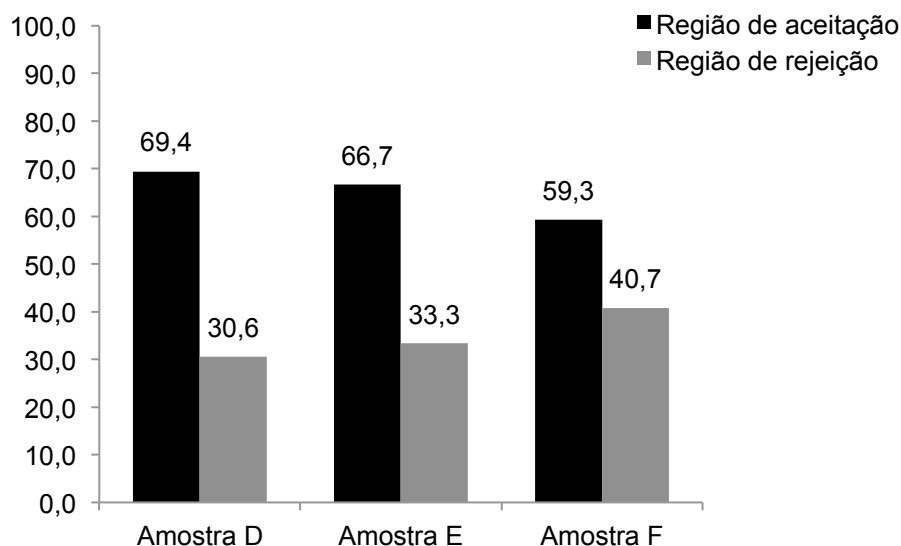


FIGURA 21 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (*L.casei*) em relação à característica sensorial “aparência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra D: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* sem adição de mel;

Amostra E: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra F: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel.

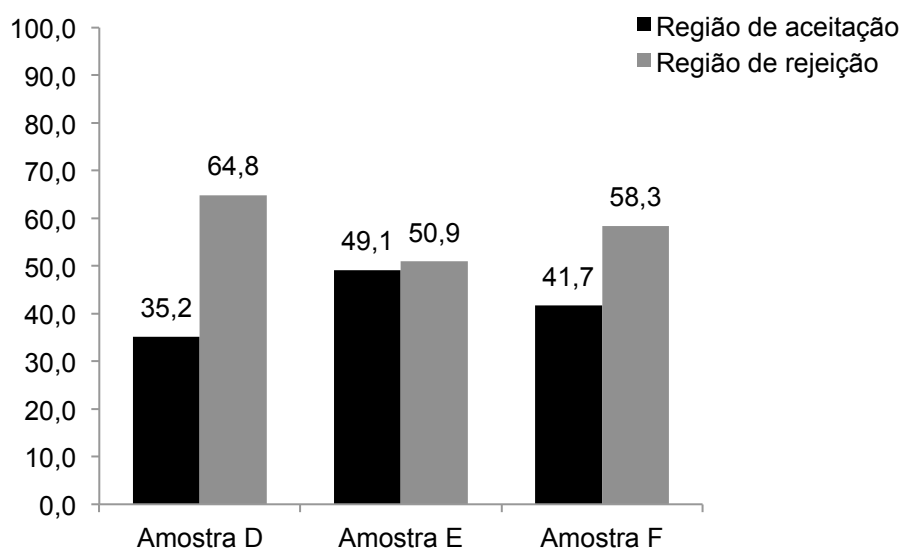


FIGURA 22 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (*L.casei*) em relação à característica sensorial “aroma” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra D: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* sem adição de mel;

Amostra E: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra F: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel.

A partir das figuras, verificou-se claramente que as três amostras foram aceitas com relação à “aparência” e que foram rejeitadas com relação ao “aroma”. Entretanto, a adição de mel não influenciou positivamente em nenhuma das duas características sensoriais.

Foi possível verificar também que na característica sensorial “aparência” as médias das amostras D e E apresentaram valores semelhantes, entretanto, superiores ao valor da média da amostra F apresentando diferença estatística a 5% (FIGURA 22). Já com relação ao “aroma” as médias das amostras D e F é que foram parecidas, entretanto, inferiores ao valor da média da amostra E apresentando diferença estatística a 5% da mesma (FIGURA 23).

Percebeu-se assim que os histogramas estão reproduzindo, novamente, com eficácia os resultados das médias obtidas e da análise estatística realizada sobre as mesmas.

Na análise das médias obtidas pelos provadores com relação ao sabor houve diferença significativa a 5% entre as três amostras D, E e F, entretanto, todas elas foram rejeitadas sensorialmente, sendo que a rejeição foi menor conforme aumentou-se a concentração do mel adicionado nas bebidas (TABELA 19). Da mesma forma, na característica sensorial “impressão global” e na “intenção de compra” os consumidores rejeitaram menos a amostra F quando comparado com as amostras D e E, ou seja, a amostra que continha o maior teor de mel.

Com isso verificou-se que, novamente, a adição de mel influenciou positivamente no sabor e, conseqüentemente, na impressão global e intenção de compra já que, através dessas sessões de análise sensorial, foi possível identificar que o sabor é o principal parâmetro pelos provadores dessa pesquisa para definir a nota da impressão global e atitude de intenção de compra com relação às amostras analisadas. Entretanto, apesar do auxílio do mel na menor rejeição das bebidas pelos consumidores, as médias mantiveram-se baixas, indicando a necessidade de uma mudança de aspecto tecnológico a fim de melhorar o sabor das bebidas como adição de aromatizantes, espessantes, pedaços de frutas, dentre outros. Os histogramas abaixo corroboram tais resultados.

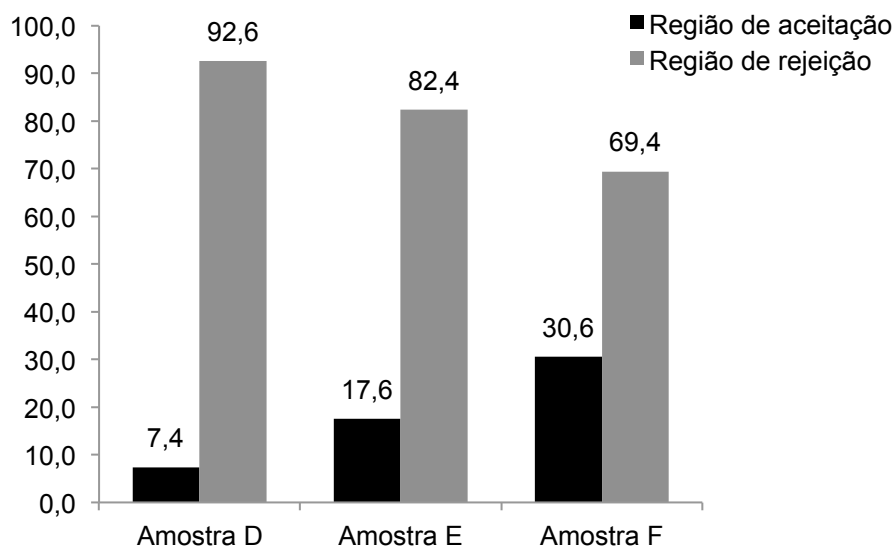


FIGURA 23 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (*L.casei*) em relação à característica sensorial “sabor” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra D: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* sem adição de mel;
Amostra E: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 3% de mel;
Amostra F: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel.

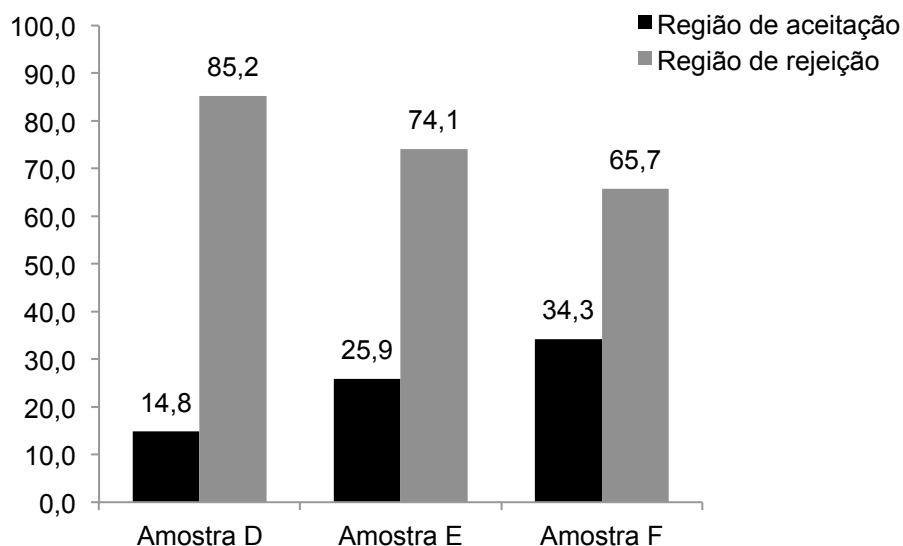


FIGURA 24 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (*L.casei*) em relação à característica sensorial “impressão global” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra D: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* sem adição de mel;
Amostra E: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 3% de mel;
Amostra F: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel.

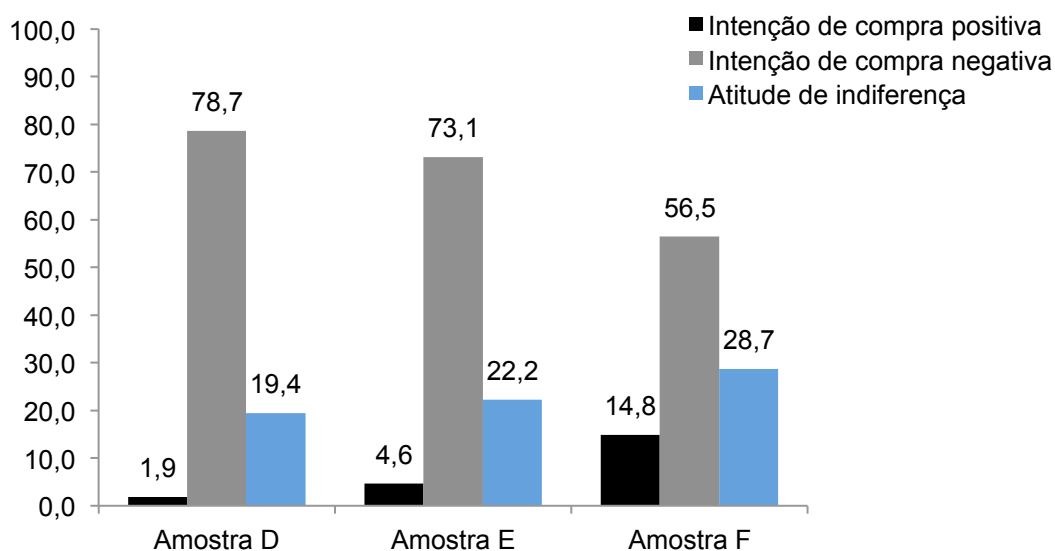


FIGURA 25 – Porcentagens de intenção de compra positiva ou negativa ou atitude de indiferença pela avaliação das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (*L.casei*) em relação ao teste de intenção de compra das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Intenção de compra positiva: notas 4 e 5. Intenção de compra negativa: notas 1 e 2. Atitude de indiferença: nota 3.

Amostra D: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* sem adição de mel;

Amostra E: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra F: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel.

Nitidamente as três amostras foram rejeitadas sensorialmente com relação ao sabor e impressão global e, ainda, apresentaram atitude de intenção de compra negativa. Foi possível verificar também que as médias de todas as três amostras apresentaram diferença estatística a 5% entre si.

Na análise das médias das notas para “consistência”, todas as amostras D, E e F apresentaram-se com valores semelhantes não havendo diferença significativa a 5% entre elas, conforme histograma da figura 26 abaixo.

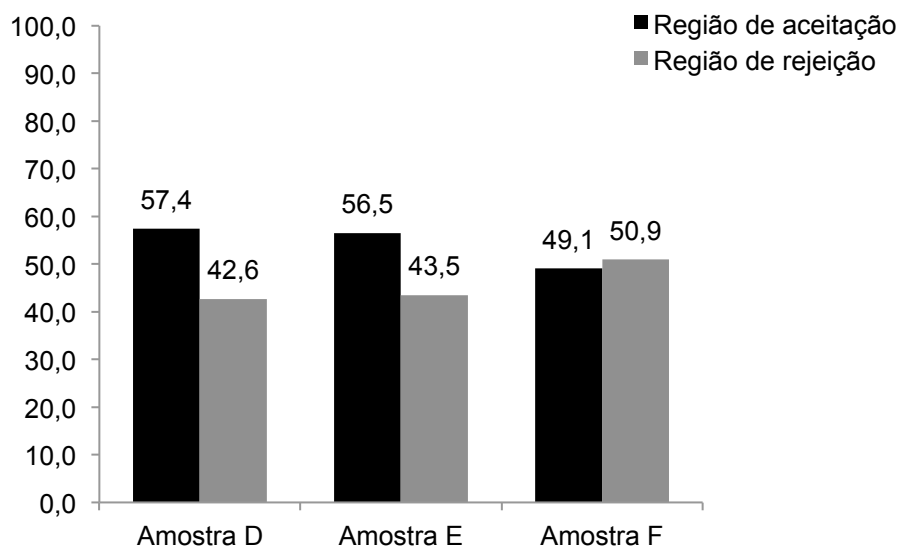


FIGURA 26 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 2ª sessão (*L.casei*) em relação à característica sensorial “consistência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra D: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* sem adição de mel;

Amostra E: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra F: Bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel.

A bebida fermentada à base de soja pelo *L.casei* com adição de 5% de mel após a fermentação - bebida F - foi considerada a bebida mais bem aceita sensorialmente dentre as bebidas da 2ª sessão, sendo então, a designada para prosseguir para a etapa de vida de prateleira deste estudo, juntamente com o seu controle sem adição de mel (bebida D com 0% de mel).

Na tabela 20 abaixo, encontram-se os resultados das médias das notas de aceitação da 3ª sessão da análise sensorial das mesmas características avaliados na primeira sessão das bebidas à base de soja adicionadas de mel após a fermentação pela mistura dos dois micro-organismos (*L.casei* e *L.acidophilus*).

TABELA 20 - Média das notas de aceitação da 3ª sessão em relação à aparência, aroma, sabor, consistência, impressão global e das notas de intenção de compra das amostras de bebidas à base de soja adicionadas de mel após o processo fermentativo pelo *L.acidophilus* e *L.casei*.

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Consistência	Impressão global	Intenção de compra
G	5,20 ^a	4,35 ^a	2,86 ^c	4,87 ^a	3,41 ^c	1,96 ^c
H	5,06 ^a	4,19 ^a	3,31 ^b	5,14 ^a	3,77 ^b	2,15 ^b
I	5,17 ^a	4,32 ^a	4,06 ^a	5,16 ^a	4,24 ^a	2,55 ^a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Amostra G: Bebida fermentada à base de soja pela mistura das culturas sem adição de mel;

Amostra H: Bebida fermentada à base de soja pela mistura das culturas com adição de 3% de mel;

Amostra I: Bebida fermentada à base de soja pela mistura das culturas com adição de 5% de mel.

Teste de aceitação: escala hedônica não estruturada de 7 cm onde o ponto âncora inferior corresponde a “desgostei muitíssimo” e o ponto âncora superior corresponde a “gostei muitíssimo”.

Teste de intenção de compra: escala hedônica estruturada de 5 pontos onde o ponto 1 corresponde a “certamente não compraria”; 2 a “possivelmente não compraria”; 3 a “talvez comprasse, talvez não comprasse”; 4 a “possivelmente compraria”; e, por fim, 5 a “certamente compraria”.

A utilização da mistura dos dois micro-organismos para o desenvolvimento das bebidas resultou em um produto final com características sensoriais mais agradáveis aos provadores do que os desenvolvidos com os micro-organismos isolados devido aos valores das médias das características sensoriais analisadas terem sido maiores do que os das sessões anteriores.

As amostras G, H e I não apresentaram diferença significativa a 5% com relação à “aparência”, ao “aroma” e à “consistência” (TABELA 20). Entretanto, analisando os valores médios das três características, as amostras foram aceitas sensorialmente pelos provadores com relação à aparência e à consistência por terem obtido médias na faixa de aceitação, enquanto que, com relação ao aroma, as mesmas foram rejeitadas sensorialmente pelos provadores por terem apresentado médias na faixa de rejeição. Os histogramas das figuras a seguir corroboram esses dados.

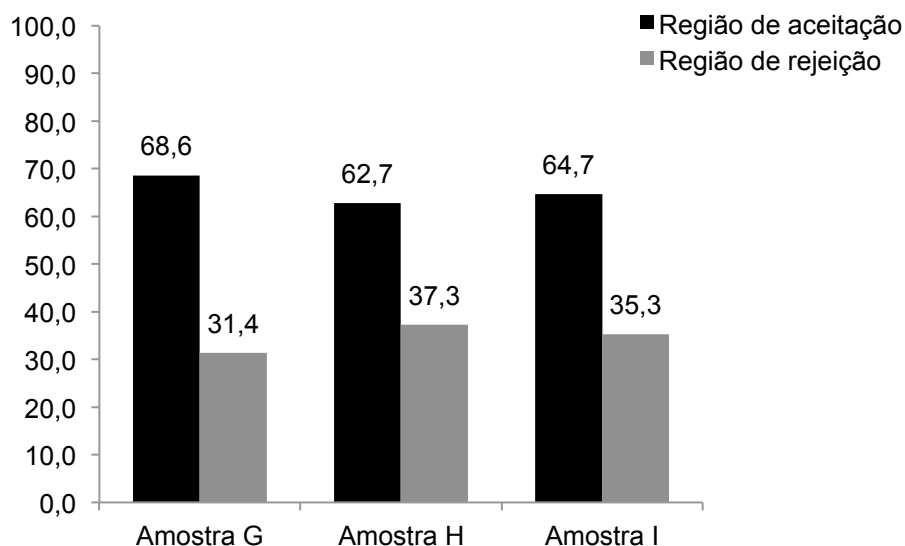


FIGURA 27 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “aparência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra G: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* sem adição de mel;

Amostra H: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra I: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 5% de mel.

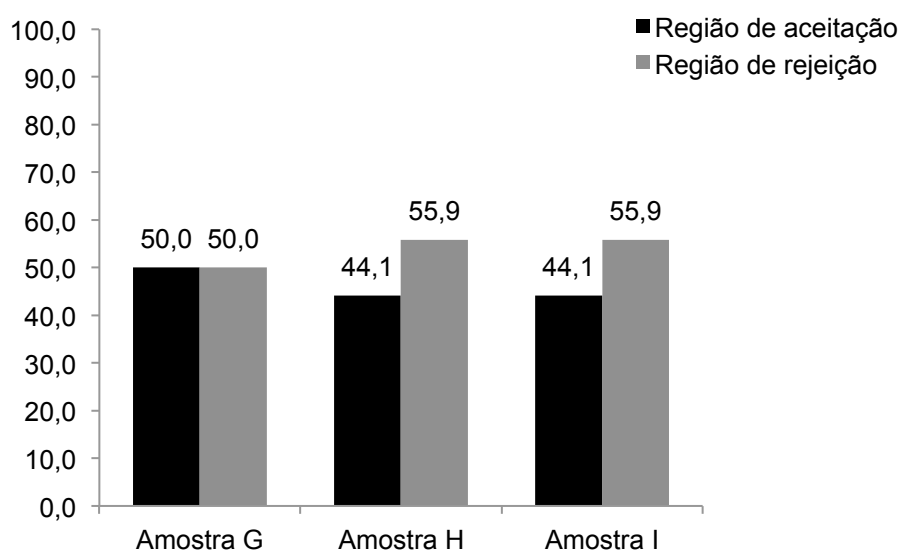


FIGURA 28 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “aroma” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra G: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* sem adição de mel;

Amostra H: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra I: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 5% de mel.

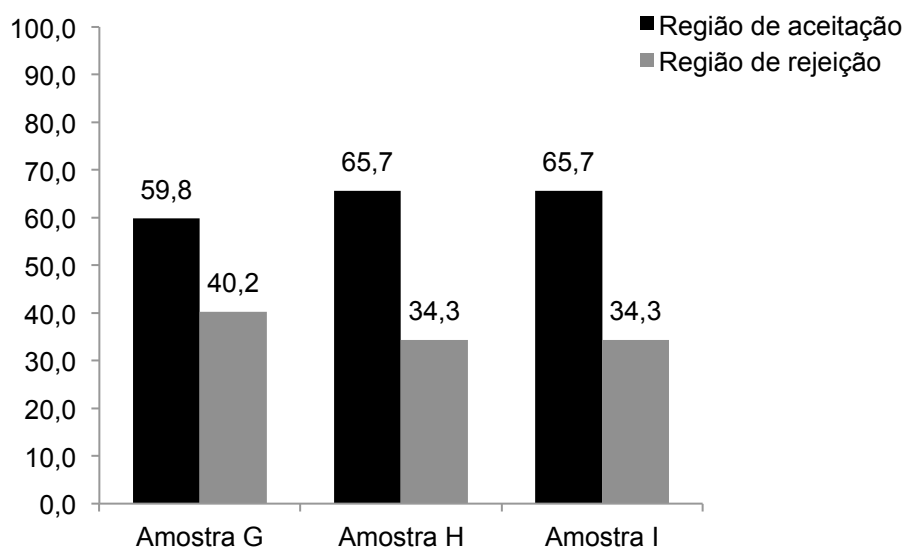


FIGURA 29 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “consistência” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra G: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* sem adição de mel;

Amostra H: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra I: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 5% de mel.

A partir das figuras, verificou-se que não houve grande variação das médias entre as amostras G, H e I com relação às características sensoriais analisadas. Porém, para a “aparência” e “consistência” as amostras se apresentaram com altos percentuais de aceitação, enquanto que para o “aroma”, as amostras se apresentaram com ligeira tendência para a faixa de rejeição. As médias não foram consideradas significativas a 5% e, por isso, os histogramas estão reproduzindo com eficácia os resultados dos valores obtidos.

Da mesma forma que nas sessões anteriores, com relação ao “sabor”, “impressão global” e atitude de “intenção de compra” houve diferença significativa a 5% entre as três amostras, entretanto, todas elas foram rejeitadas sensorialmente,

sendo que a rejeição foi menor para a amostra I, seguida da amostra H e, finalmente, da amostra G (TABELA 20). Os histogramas abaixo confirmam tais resultados.

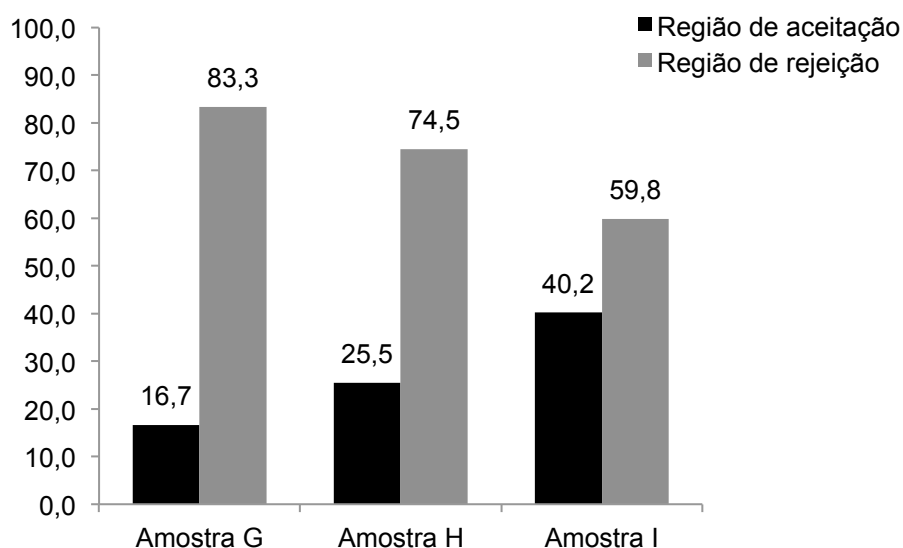


FIGURA 30 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “sabor” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra G: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* sem adição de mel;

Amostra H: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra I: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 5% de mel.

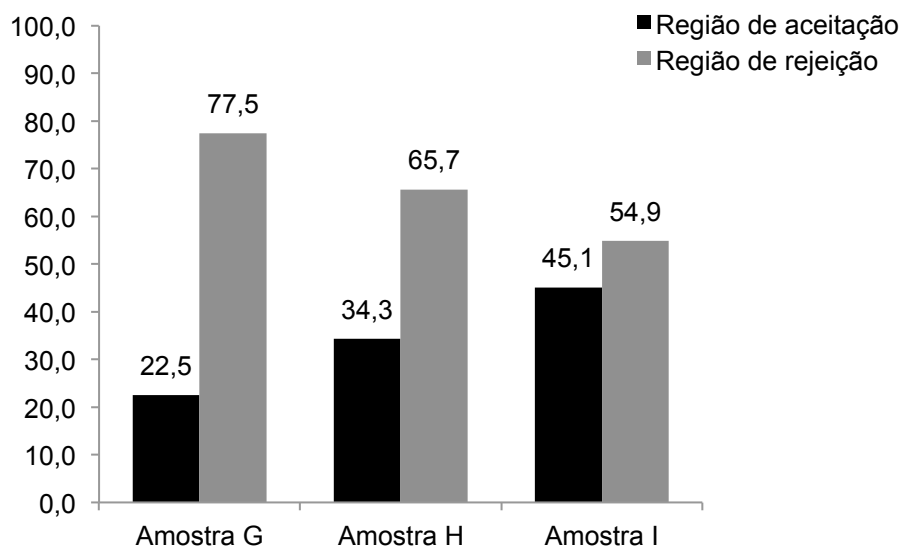


FIGURA 31 - Histograma de frequência das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação à característica sensorial “impressão global” das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Região de aceitação = notas de 4,51 a 8,00; região de rejeição = notas de 1,00 a 4,50.

Amostra G: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* sem adição de mel;

Amostra H: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra I: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 5% de mel.

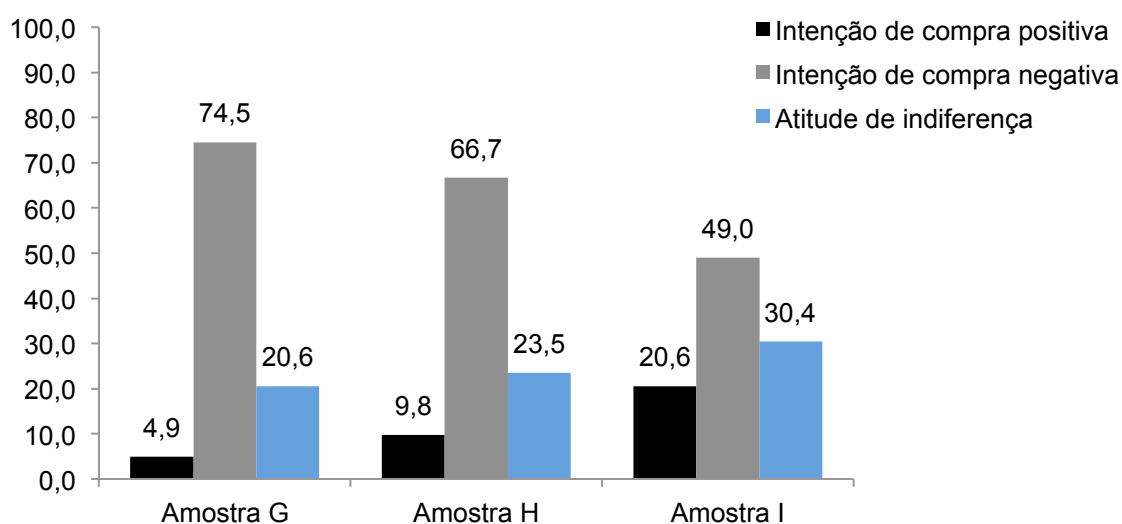


FIGURA 32 – Porcentagens de intenção de compra positiva ou negativa ou atitude de indiferença pela avaliação das notas atribuídas pelos provadores da 3ª sessão (mistura dos micro-organismos *L.acidophilus* com *L.casei*) em relação ao teste de intenção de compra das amostras de bebidas fermentadas à base de EHS. Intenção de compra positiva: notas 4 e 5. Intenção de compra negativa: notas 1 e 2. Atitude de indiferença: nota 3.

Amostra G: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* sem adição de mel;

Amostra H: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 3% de mel;

Amostra I: Bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* c/ *L.casei* com adição de 5% de mel.

De acordo com os histogramas de frequência para “sabor”, “impressão global” e “intenção de compra”, todas as amostras se encontraram na faixa de rejeição, entretanto, a adição de mel influenciou de forma positiva na opinião dos provadores, pois as médias foram aumentando de acordo com a concentração de mel adicionada.

A bebida fermentada à base de soja pela mistura do *L.acidophilus* com *L.casei* com adição de 5% de mel após a fermentação - bebida I - foi considerada a bebida mais bem aceita sensorialmente dentre as bebidas da 3ª sessão, sendo então, a designada para prosseguir para a etapa de vida de prateleira deste estudo, juntamente com o seu controle sem adição de mel (bebida G com 0% de mel).

É importante ressaltar que, em todas as três sessões, ocorreram situações que foram semelhantes entre si caracterizando o comportamento dos provadores como homogêneo durante a avaliação sensorial das amostras. Pode-se perceber nitidamente que, em todas as sessões, as bebidas selecionadas para dar prosseguimento a este trabalho foram as em que houve a adição de 5% de mel de abelha. Assim, sugere-se que o mel pode ter influenciado positivamente as bebidas C, F e I que apresentaram os melhores resultados de aceitação entre os provadores.

Em todas as sessões, as três amostras analisadas apresentaram diferenças significativas a 5% com relação ao sabor, à impressão global e à atitude de intenção de compra. Entretanto, todas foram rejeitadas sensorialmente devido às médias baixas sendo que a rejeição foi menor para a amostra com maior adição de mel, seguida da amostra com adição de 3% de mel e, finalmente, da amostra controle, sem adição de mel. Dessa forma verificou-se, em todas as sessões, que o mel influenciou positivamente no sabor e, ainda, que essa característica sensorial é determinante na avaliação sensorial da impressão global e na intenção de compra das bebidas para os provadores em questão. Assim é fundamental a melhoria do sabor destes produtos a fim de aumentar a aceitação pelos consumidores.

Uma hipótese de que o mel influencia positivamente no sabor é que os açúcares presentes nesse alimento podem mascarar, em parte, a acidez das

bebidas fermentadas e, ainda, proporcionar um sabor mais agradável e adocicado nas bebidas, mascarando o gosto residual típico das bebidas à base de extrato de soja.

Algumas sugestões tecnológicas para a melhoria do sabor nas bebidas são aumentar a concentração de mel a ser adicionado, utilizar aromatizantes/espessantes, adicionar pedaços de frutas, dentre outras.

A bebida fermentada pela mistura dos micro-organismos (*L.casei* e *L.acidophilus*) com adição de 5% de mel foi a que obteve destaque por ter resultado nas maiores médias em todas as características sensoriais e no teste de atitude de intenção de compra. Dessa forma, foi considerada a bebida mais adequada, com relação aos resultados da análise sensorial, a dar prosseguimento em estudos futuros.

No estudo de Barbosa (2007), no qual o objetivo era desenvolver uma bebida fermentada probiótica à base de extrato de soja e saborizada com sacarose e polpa de pêsego, na etapa de análise sensorial do trabalho, foi verificado que a sacarose apresentou significância linear e positiva. Ou seja, quanto mais sacarose era adicionada à bebida, maior era a sua aceitação pelos consumidores, havendo um aumento da preferência da bebida em relação à doçura. De acordo com o autor da pesquisa, esse resultado era esperado visto que a sacarose e o sabor resultante de produtos fermentados mascaram o sabor de produtos à base de soja tão indesejáveis pelos consumidores.

Assim, como a aceitação pelos consumidores do extrato de soja em sua forma pura ainda é limitada, são desenvolvidas tecnologias para melhorar a qualidade sensorial destes produtos alcançando resultados bastante positivos como é o caso da adição de ingredientes que conferem doçura e/ou aromatizantes com o intuito de melhorar o sabor (RODRIGUES, 2003).

Valim et al. (2003) em seu estudo, obteve excelentes resultados de aceitação sensorial em bebida à base de suco de laranja e extrato aquoso de soja. Da mesma forma, Chauhan et al. (1993) ao testarem diferentes combinações de polpa de manga com isolado protéico de soja na elaboração de uma bebida, verificaram que a formulação com maior quantidade de polpa de manga foi a mais bem aceita sensorialmente por ter contribuído significativamente na melhora do sabor e textura da bebida desenvolvida. Portanto, verifica-se que a suplementação das bebidas fermentadas de soja com substâncias saborizantes como açúcares e

polpas de frutas é uma opção para melhorar e/ou incrementar as características sensoriais e a aceitabilidade do produto, porém é desconhecida a influência destas substâncias saborizantes sobre a fermentação das bactérias probióticas.

Segundo Dutcosky (1996), uma amostra é considerada bem aceita quando apresenta Índice de Aceitabilidade maior ou igual a 70%.

Bobbio & Bobbio (1995) relataram que a primeira impressão que se tem de um alimento é o seu visual. Assim, a aparência é um dos principais aspectos observados na qualidade e aceitação de um produto.

Felberg et al. (2004), ao estudar a aceitabilidade de uma bebida composta por soja integral e castanha do brasil com EHS a 10% desprovido de lipoxigenases, obtiveram um índice de aceitação entre 4,2 a 4,5 numa escala de 9 pontos, ou seja, uma aceitação de, aproximadamente, 50%, e enquadramento na área de indiferença. Behrens (2002), também verificou em seu estudo uma grande rejeição pelos provadores de bebidas à base de EHS fermentadas por micro-organismos probióticos adicionadas de sacarose ou lactose (2% m/v), obtendo uma nota média de aceitação do sabor de, aproximadamente, 3,28, que corresponde a um nível de 36,5% de índice de aceitabilidade, sendo nitidamente rejeitadas pelos consumidores por estarem enquadradas na área de rejeição.

Corroborando esses dados, Kopper (2009), verificou que nenhuma de suas formulações à base de EHS alcançou o índice mínimo de aceitação de 70% com relação ao sabor, apesar de todas as suas bebidas terem apresentado uma aceitação acima de 60%. Entretanto, é importante ressaltar que, em seu estudo, 80% dos provadores relataram consumir com frequência algum produto à base de soja, o que pode ser considerado um suposto indicativo de que gostam desse tipo de alimento, diferentemente do encontrado neste trabalho, onde apenas 12% consomem frequentemente esses produtos. Essa baixa frequência de consumo de alimentos à base de soja por parte dos provadores do presente estudo, pode ter interferido no alto índice de rejeição das bebidas.

O mercado deve investir mais neste segmento de produtos à base de soja, levando em consideração, principalmente, os aspectos sensoriais dos produtos como o sabor, principal item avaliado pelos consumidores e divulgar de maneira ampla os benefícios a quem os consomem.

4.7 ESTUDO DA VIDA DE PRATELEIRA DAS BEBIDAS FERMENTADAS

4.7.1 Análise de acidez total e pH

Nas tabelas 21, 22 e 23 abaixo estão apresentados os resultados do pH e acidez total em ácido láctico nos tempos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração controlada, das bebidas fermentadas que foram selecionadas na análise sensorial, ou seja, as bebidas adicionadas de 5% de mel após a fermentação, para o estudo de vida de prateleira e seus respectivos controles.

TABELA 21 - Determinação do pH e acidez total das bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus* durante a vida de prateleira.

Tempo (dias)	<i>L.acidophilus</i>			
	Bebida A (0% mel)		Bebida C (5% mel)	
	pH	ATT (%)	pH	ATT (%)
1	4,30 ^a	0,43 ± 0,02 ^a	4,22 ^a	0,44 ± 0,03 ^c
7	4,25 ^b	0,44 ± 0,07 ^a	4,16 ^b	0,50 ± 0,03 ^b
14	4,15 ^d	0,45 ± 0,01 ^a	3,97 ^c	0,50 ± 0,01 ^{a,b}
21	4,06 ^e	0,43 ± 0,01 ^a	3,84 ^d	0,51 ± 0,03 ^{a,b}
28	4,19 ^c	0,46 ± 0,01 ^a	4,00 ^c	0,54 ± 0,03 ^a

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão. Análises em triplicata.
(^{a, b, c, d, e}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 22 - Determinação do pH e acidez total das bebidas fermentadas pelo *L.casei* durante a vida de prateleira.

Tempo (dias)	<i>L.casei</i>			
	Bebida D (0% mel)		Bebida F (5% mel)	
	pH	ATT (%)	pH	ATT (%)
1	4,16 ^{a,b}	0,51 ± 0,03 ^a	4,08 ^a	0,56 ± 0,03 ^d
7	4,13 ^b	0,54 ± 0,00 ^a	4,01 ^b	0,65 ± 0,04 ^c
14	4,08 ^c	0,51 ± 0,02 ^a	3,86 ^d	0,67 ± 0,05 ^c
21	4,20 ^a	0,51 ± 0,03 ^a	3,90 ^c	0,71 ± 0,04 ^b
28	4,15 ^b	0,53 ± 0,01 ^a	3,78 ^e	0,76 ± 0,06 ^a

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão. Análises em triplicata.
(^{a, b, c, d, e}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 23 - Determinação do pH e acidez total das bebidas fermentadas pela mistura do *L.acidophilus* com *L.casei* durante a vida de prateleira.

Tempo (dias)	Mistura do <i>L.acidophilus</i> com <i>L.casei</i>			
	Bebida G (0% mel)		Bebida I (5% mel)	
	pH	ATT (%)	pH	ATT (%)
1	4,16 ^b	0,47 ± 0,02 ^a	4,15 ^a	0,47 ± 0,04 ^d
7	4,26 ^a	0,49 ± 0,04 ^a	4,01 ^b	0,57 ± 0,03 ^c
14	4,10 ^c	0,46 ± 0,05 ^a	3,79 ^c	0,61 ± 0,03 ^b
21	3,96 ^d	0,47 ± 0,02 ^a	3,58 ^e	0,63 ± 0,03 ^b
28	4,11 ^c	0,49 ± 0,04 ^a	3,70 ^d	0,69 ± 0,03 ^a

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão. Análises em triplicata. (^{a, b, c, d, e}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pode-se observar que durante o período de armazenamento, todas as bebidas apresentaram diminuição significativa de pH ($p < 0,05$) (TABELAS 21, 22 e 23). Observa-se uma variação de 4,08 a 4,30 e de 3,70 a 4,19 nos valores de pH inicial e final, respectivamente, sendo que o menor valor de pH final foi encontrado na bebida fermentada pela mistura do *L. acidophilus* com *L.casei* com valor de 3,70 (TABELA 23).

Em trabalho semelhante relacionado ao estudo da vida de prateleira de bebidas à base de EHS fermentadas por micro-organismos probióticos, Kopper (2009) verificou que as bebidas desenvolvidas em seu estudo apresentaram pH inicial e final próximos a 4,40 e 3,80, respectivamente. Da mesma forma, Evangelista (2011) observou que os valores de pH das bebidas produzidas foram diminuindo ao longo do período de estocagem, chegando ao menor valor final de 4,08. Barbosa (2007) ao analisar o pH das bebidas produzidas após 7 dias de armazenamento verificou uma pequena redução dos seus valores, da mesma forma que Oliveira e Damini (2000) em estudo parecido com análise do pH durante o tempo de armazenamento de leites fermentados.

Analisando os dados das tabelas 21, 22 e 23 percebe-se também que o pH inicial das bebidas em que o mel foi adicionado (5% m/v) apresentou menores valores do que as suas respectivas bebidas controle. Isso porque o mel é um alimento ácido com pH próximo a 3,91 (CAMPOS, 1987), portanto, quando

adicionado no alimento ele naturalmente aumenta a sua acidez. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Macedo (2007) ao verificar que os valores médios de pH resultantes das bebidas fermentadas pelas bifidobactérias na presença de mel (3% p/v) foram significativamente menores ($p < 0,05$) dos controles sem mel.

A redução do pH durante o tempo de armazenamento está relacionada ao evento da pós-acidificação que ocorre durante a estocagem do produto em temperaturas mais baixas, sendo que a diminuição do pH acontece devido à produção de ácido láctico por micro-organismos que sobrevivem bem ao armazenamento refrigerado, como é o caso do *L.acidophilus* (FERREIRA, 1999). Semelhantemente Tamime & Robinson (1991) relatam que o valor do pH interfere nas atividades metabólicas das bactérias, podendo ser favorável ou não para certos grupos de culturas como é o caso dos micro-organismos do gênero *Lactobacillus* que crescem e toleram valores de pH mais baixos.

Essas alterações nos valores de pH ocorrem devido a vários fatores que podem estar envolvidos na produção do alimento como o tipo e porcentagem de cultura utilizada no desenvolvimento do produto, a atividade de cultura escolhida, o valor do pH determinado para finalizar a fermentação, o tempo de armazenamento (THAMER & PENNA, 2006), assim como os ingredientes adicionados, a temperatura de fermentação, dentre outros.

De acordo com os resultados verifica-se também que houve um pequeno aumento nos valores de pH na última semana de estocagem, do 21º dia para o 28º dia, com exceção apenas das bebidas fermentadas pelo *L.casei* (bebidas D e F). Este resultado é semelhante ao encontrado no estudo de Mondragón-Bernal (2004) onde após 60 horas de fermentação, as bebidas fermentadas pelos *L.acidophilus* apresentaram um leve incremento do pH, causado provavelmente por autólise desses micro-organismos.

Como se pode observar nas tabelas 21, 22 e 23 e na figura 16 (Apêndice J) houve um aumento gradual de ácidos durante todo o período de armazenamento em todas as bebidas analisadas. Este resultado já era esperado visto que, como relatado anteriormente, os micro-organismos continuaram crescendo nas bebidas mesmo durante a refrigeração, apesar de ser em uma velocidade bastante inferior à da fermentação. Observações semelhantes foram relatadas por Mondragón-Bernal (2009), Evangelista (2011), Barbosa (2007) e Kopper (2009).

A acidez titulável das bebidas controle ao longo do tempo de armazenamento não sofreu alteração ($p < 0,05$), apesar do pH dessas bebidas ter apresentado valores significativamente menores durante a vida de prateleira. Já nas bebidas em que foram adicionados 5% (m/v) de mel, houve alteração significativa na acidez titulável (FIGURA 16 no APÊNDICE J e TABELAS 21, 22 e 23). Esse aumento na acidez possivelmente se deve ao fato do mel conter açúcares fermentáveis os quais foram utilizados pelos micro-organismos probióticos e conseqüentemente aumentando a produção de ácidos na bebida. No presente trabalho, pode ser observado que os valores maiores de acidez nas bebidas fermentadas com as diferentes culturas microbianas testadas ocorreram com a mistura do *L.acidophilus* com o *L.casei* com adição de 5% de mel e com o *L.casei* adicionado de 5% de mel, que com 28 dias de estocagem atingiram valores de acidez de 0,69% e 0,76%, respectivamente. Diferentemente do resultado encontrado por Macedo (2008) ao verificar que a maior produção de ácido láctico, em seu estudo, ocorreu com a linhagem do *L.acidophilus* SACCO®, apresentando facilidade de adaptação a meios ácidos já que se manteve em níveis de 8,33 log UFC/mL durante 46 dias de estocagem.

De acordo com Gurgel & Oliveira (1995), durante a estocagem refrigerada de bebidas fermentadas, pode haver um aumento da acidez titulável. Essa mudança na acidez do produto pode ocorrer em maior ou menor grau, dependendo da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas e também está relacionado às mudanças nos valores de pH durante o armazenamento. Por definição, a pós-acidificação é a produção de ácido láctico durante a refrigeração e estocagem de produtos (ANTUNES, 2004).

4.7.2 Viabilidade das culturas microbianas

Nas tabelas 24, 25 e 26 abaixo estão apresentados os resultados da contagem microbiana durante a vida de prateleira sob refrigeração controlada das bebidas fermentadas selecionadas na análise sensorial e os seus controles.

TABELA 24 – Contagem microbiana das bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus* durante a vida de prateleira.

Tempo (dias)	<i>L.acidophilus</i>	
	Bebida A (0% mel)	Bebida C (5% mel)
Contagem (log UFC/mL)		
1	6,33 ± 0,47 ^a	6,95 ± 0,80 ^a
7	6,50 ± 0,50 ^a	6,39 ± 0,75 ^a
14	5,95 ± 0,17 ^b	6,02 ± 0,46 ^a
21	5,87 ± 0,36 ^b	6,02 ± 0,70 ^a
28	5,24 ± 0,49 ^c	5,92 ± 0,90 ^a

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão. Análises em triplicata. (^{a, b, c, d, e}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 25 – Contagem microbiana das bebidas fermentadas pelo *L.casei* durante a vida de prateleira.

Tempo (dias)	<i>L.casei</i>	
	Bebida D (0% mel)	Bebida F (5% mel)
Contagem (log UFC/mL)		
1	8,66 ± 0,55 ^b	8,80 ± 0,37 ^a
7	8,77 ± 0,38 ^a	8,61 ± 0,17 ^b
14	8,17 ± 0,23 ^c	8,41 ± 0,33 ^c
21	8,34 ± 0,44 ^c	8,38 ± 0,22 ^c
28	8,35 ± 0,38 ^c	8,44 ± 0,18 ^c

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão. Análises em triplicata. (^{a, b, c, d, e}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 26 – Contagem microbiana das bebidas fermentadas pela mistura do *L.acidophilus* com *L.casei* durante a vida de prateleira.

Tempo (dias)	Mistura do <i>L.acidophilus</i> com <i>L.casei</i>	
	Bebida G (0% mel)	Bebida I (5% mel)
	Contagem (log UFC/mL)	
1	8,50 ± 0,13 ^a	8,40 ± 0,11 ^a
7	8,47 ± 0,12 ^a	8,48 ± 0,11 ^a
14	8,36 ± 0,14 ^{a,b}	8,38 ± 0,24 ^a
21	8,23 ± 0,16 ^b	8,31 ± 0,24 ^a
28	8,21 ± 0,28 ^b	8,18 ± 0,31 ^a

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão. Análises em triplicata. (^{a, b, c, d, e}): Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A figura 17 no apêndice J representa os valores médios encontrados das contagens das células viáveis probióticas das bebidas fermentadas durante o tempo de estudo das análises de vida de prateleira.

De acordo com a ANVISA (2008), a recomendação atual de consumo é baseada na ingestão diária de 8 log a 9 log UFC/dia de micro-organismos viáveis. Como a porção diária de leite fermentado é estabelecida em 200 mL (ANVISA, 2003) conclui-se que cada 1 mL de bebida fermentada deve ter, no mínimo, 10⁶ UFC ou 6 log UFC de culturas probióticas para o produto ser considerado funcional.

De acordo com o exposto, verifica-se que as bebidas fermentadas com *L.casei* e as fermentadas pela mistura das duas culturas mantiveram-se com contagem de células viáveis variando de 8,44 a 8,66 log UFC/mL e 8,21 a 8,40 log UFC/ mL, respectivamente, durante os 28 dias de armazenamento a uma temperatura controlada de 4°C, independentes de terem sido adicionadas de mel ou não (TABELAS 25 e 26). Dessa forma, atenderam à legislação brasileira e por isso podem ser consideradas probióticas. Já as bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus*, apresentaram contagens de células viáveis até o 21º dia e somente até o 7º dia, com adição de 0% e 5% de mel, respectivamente. A partir desse tempo, houve um declínio para uma concentração menor que 6 log UFC/mL, dessa forma, deixaram de ser caracterizadas como bebidas probióticas (TABELA 24).

Observa-se que em todas as bebidas fermentadas houve uma diminuição da contagem de micro-organismos probióticos durante o tempo de armazenamento.

Essa redução foi considerada significativa ($p < 0,05$) (FIGURA 17 no APÊNDICE J e TABELAS 24, 25 e 26) na maioria das bebidas, com exceção somente das bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus* e pela mistura das duas culturas, ambas adicionadas de 5% de mel. Resultados semelhantes foram encontrados por Macedo (2007) que estudou as propriedades prebióticas e antimicrobianas de mel de abelha adicionado em leites fermentados por Lactobacilos e verificou uma diminuição progressiva nas contagens de células durante o tempo de armazenamento de 46 dias.

Oliveira et al (2002) relataram a redução de um ciclo logarítmico nas contagens de células em bebidas de leite fermentadas com *L.acidophilus* após 28 dias de estocagem a 4°C.

Kopper (2009) constatou em sua pesquisa com EHS fermentado uma queda da concentração de células viáveis de *L.acidophilus* de 10,36 log UFC/mL para 7,15 log UFC/mL, após 28 dias de armazenamento. Entretanto, apesar da contagem de células ter diminuído, permaneceu superior à contagem mínima o que, de acordo com a legislação, o alimento pode ser considerado probiótico até este período de estocagem.

Evangelista (2011) em seu estudo, também observou uma pequena variação na concentração de células no decorrer da análise de vida de prateleira das bebidas produzidas, entretanto, todas as bebidas apresentaram valores acima do mínimo exigido pela legislação variando de $1,1 \times 10^8$ a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL. Ainda de acordo com o autor, quanto maior a concentração de micro-organismos utilizada como inóculo, menor foi a velocidade específica de crescimento microbiano durante a vida-de-prateleira. Diferentemente do preconizado por Oliveira et al. (2002) e Barreto et al. (2003), que em seus estudos ressaltam que, contagens microbianas mais elevadas no inóculo indicam a possibilidade de garantia do nível mínimo de células nos produtos durante o armazenamento, atendendo aos parâmetros da legislação.

Barbosa (2007) ao desenvolver uma bebida probiótica com *L.acidophilus* saborizada com sacarose e polpa de pêssigo, também verificou um pequeno declínio nas células viáveis durante os 7 dias de armazenamento.

Barreto et al (2003) avaliaram a viabilidade do *L.acidophilus*, das bifidobactérias e de bactérias totais em 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comercializados no Brasil e encontraram contagens em desacordo com a legislação em 52% de produtos contendo o probiótico *L.acidophilus* e em 64% das

amostras de produtos contendo Bifidobactérias, com contagens inferiores a 5 log UFC/mL.

Em estudos realizados sobre a vida de prateleira de bebidas fermentadas com probióticos e estocadas sobre refrigeração, grande parte manteve estável a concentração de células no produto (ZACARCHENCO & MASSAGUER-ROIG, 2004; DONKOR et al., 2007; VINDEROLA et al., 2000) o que corrobora com os trabalhos citados anteriormente onde todos eles, apesar do decréscimo, mantiveram a quantidade mínima necessária, de acordo com a legislação, para serem considerados alimentos probióticos.

Ainda de acordo com a figura 17 (APÊNDICE J), apesar de todas as bebidas terem apresentado redução nas contagens durante os 28 dias de análise, as bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus* e pela mistura das duas culturas, ambas adicionadas de 5% de mel tiveram as suas diminuições avaliadas como não significativas ($p < 0,05$) (TABELAS 24 e 26), indicando que o mel pode ter influenciado na manutenção do nível inicial de contagem dessas culturas, com exceção da bebida fermentada pelo *L.casei* adicionada de 5% de mel (TABELA 25).

Macedo (2007) sugere que o mel, por conter uma série de oligossacarídeos pode estimular o crescimento, a atividade e a viabilidade de bactérias probióticas, uma vez que são considerados substâncias prebióticas. Os oligossacarídeos são um dos principais prebióticos conhecidos e têm recebido cada vez mais destaque e atenção nos últimos tempos. São açúcares encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como nas frutas, nos vegetais, no leite e no mel (ALMEIDA & PASTORE, 2004). Assim, por conter comprovadamente muitos oligossacarídeos, foi sugerido que o mel exerça efeito prebiótico sobre a microbiota colônica intestinal, atuando sobre lactobacilos e bifidobactérias (LEITE et al., 2000).

Vilalluenga et al. (2006) avaliaram a influência da rafinose, um oligossacarídeo, sobre a manutenção das células viáveis de *Bifidobacterium lactis* e *L.acidophilus* em leites fermentados durante o tempo de 21 dias sob refrigeração a 4°C. Foi verificado um aumento na contagem dos probióticos na presença da rafinose, com médias de contagens de 7 log UFC/mL de micro-organismos probióticos contra uma média de 6,2 log UFC/mL de culturas nos leites fermentados controle, ou seja, bebidas em que não houve a adição de rafinose no armazenamento.

Verificando os dados da tabela 25, percebe-se que o maior número de células viáveis ao final dos 28 dias de armazenamento das bebidas a 4°C foi encontrado nas bebidas fermentadas pelo *L.casei*. A bebida fermentada com 5% de mel apresentou a maior contagem de células, 8,44 log UFC/mL e a bebida fermentada sem mel apresentou média de 8,35 log UFC/mL. Este resultado é semelhante ao encontrado por Macedo (2007) ao verificar que o leite fermentado por *L.casei* com 3% de mel foi o que apresentou maior contagem final (9,21 log UFC/mL) durante a vida de prateleira quando comparado com os outros leites fermentados estudados.

De acordo com os dados mostrados, verifica-se que a adição do mel nas bebidas fermentadas na concentração de 5% não influenciou significativamente ($p < 0,05$) o crescimento e a viabilidade dos micro-organismos probióticos durante a vida de prateleira das mesmas (TABELAS 24, 25 e 26). Ou seja, as bebidas adicionadas de mel não fizeram com que elas apresentassem contagens maiores de micro-organismos probióticos quando comparadas aos seus controles. Entretanto, verificou-se a manutenção do nível inicial de contagem das células viáveis nessas bebidas, conforme foi mostrado e discutido anteriormente a partir dos resultados da figura 17 (APÊNDICE J), possivelmente devido ao mel que foi adicionado nas bebidas. Porém, mais estudos são necessários para verificar essa hipótese.

Estudos semelhantes foram realizados ao avaliarem os efeitos da adição do mel em bebidas fermentadas, como o de Varga (2006), que verificou que a adição de 1% e 5% de mel (p/v) em iogurtes refrigerados não resultou em influência significativa nas características sensoriais do produto ou na viabilidade dos micro-organismos fermentativos ao longo de seis semanas de armazenamento a uma temperatura de 4°C.

Macedo (2007) sugere que, além do efeito prebiótico sobre a microbiota intestinal, o mel apresenta propriedades antimicrobianas inerentes como a alta pressão osmótica e o baixo pH, dentre outros, que limitam a sobrevivência e o desenvolvimento de grande parte dos micro-organismos. Assim, a fim de avaliar a influência do mel em leites fermentados, o autor verificou que a adição de 3% de mel (p/v) em leites fermentados, não influenciou significativamente ($p < 0,05$) o crescimento e a viabilidade da cultura *L.casei* quando comparadas com os seus controles. Entretanto, para o *L.acidophilus* SACOO®, o mel utilizado contribuiu de forma significativa ($p < 0,05$) para o crescimento e manutenção da viabilidade, com

valor de contagem próximo a 8,33 log UFC/mL durante os 46 dias de armazenamento, enquanto no controle houve uma redução de, aproximadamente, um ciclo logarítmico. Contribuiu também para a cultura de *Bifidobacterium lactis* SACCO® com 46 dias de armazenamento a 7°C que aumentou sua contagem de 8,94 log UFC/mL no dia 1 para 9,11 log UFC/mL no último dia de análise. Entretanto, para o *L.acidophilus* LA-5 da Christian Hansen® o mel não exerceu influência significativa ($p < 0,05$).

Curda e Plockova (1995) avaliaram o efeito do mel em concentrações de 0, 1, 3, 5 e 10% adicionados em leite sobre o crescimento de *L.acidophilus* e culturas de bactérias mesófilas e verificaram que o *L.acidophilus* foi inibido em concentrações superiores a 5% de mel e as culturas mesófilas com 10% de mel.

Chick, Shin e Ustinol (2001), verificaram que a adição de mel em leites fermentados não foi inibitória para as culturas. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a influência do mel e de outros açúcares na acidez das bebidas e viabilidade de quatro culturas: *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrukeii subsp bulgaricus* e *Bifidobacterium bifidum*. O leite foi suplementado com 5% de mel, 5% de frutose e 5% de sacarose, separadamente. Como resultado, a adição de 5% de mel não foi inibitória para nenhuma das culturas. Além disso, todas as culturas permaneceram com contagem de células viáveis, e ainda, a produção de ácido láctico pela *B.bifidum* foi significativamente maior na presença de mel em relação aos outros açúcares. Isto porque o mel contém um alto teor de carboidratos fermentáveis, propiciando uma maior produção de ácido e, também, o abaixamento do pH.

Kajiwara, Gandhi e Ustunol (2002), verificaram o crescimento de bifidobactérias em meio de cultura suplementado com 5% de mel, por 48 horas de incubação a 37°C e anaerobiose. Esses autores relataram que houve aumento significativo do crescimento das culturas suplementadas com mel ou oligossacarídeos.

Diversos fatores podem reduzir a viabilidade e, conseqüentemente, as propriedades probióticas dos micro-organismos. São eles: acidificação do produto final, ácidos produzidos durante o armazenamento, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem, compostos antimicrobianos, dentre outros (ANDRIGHETTO & GOMES, 2003).

5 CONCLUSÃO

A bebida fermentada pelo *L.casei*, sem adição de mel de abelha demorou 25 horas para atingir o pH desejado, valor superior ao tempo gasto pelo *L. acidophilus* e a mistura de *L.acidophilus* e *L.casei*, que foi de 9,5 horas e 10 horas, respectivamente.

A adição de 3 e 5% de mel ao EHS ocasionou redução no tempo de fermentação para todos os micro-organismos testados, sendo a redução de aproximadamente 60% no tempo de fermentação nas bebidas obtidas com o *L.casei*.

Dentre os micro-organismos testados o *L. casei* foi o que apresentou maior crescimento no EHS, independentemente da adição de mel. O mel de abelha na concentração de 3% favoreceu o crescimento de *L. acidophilus* e na concentração de 5% inibiu o crescimento.

Nos testes sensoriais, a bebida fermentada pela mistura dos micro-organismos (*Lcasei* e *L.acidophilus*) com adição de 5% de mel foi a que obteve destaque por ter resultado nas maiores médias de aceitação em todas as características sensoriais e no teste de atitude de intenção de compra. Dessa forma, foi considerada a bebida mais adequada, com relação aos resultados da análise sensorial, para dar prosseguimento a estudos futuros.

As linhagens de *L.casei* e a cultura mista de *L.casei* e *L.acidophilus* permaneceram viáveis nas bebidas durante os 28 dias de armazenamento, com contagens maiores do que os valores mínimos exigidos pela legislação brasileira para serem consideradas probióticas. A linhagem de *L.acidophilus* permaneceu viável até o 21º dia de armazenamento na bebida adicionada de 5% de mel e até o 7º dia na bebida sem adição de mel, com contagens de células superiores log 6 UFC/mL. A adição de mel nas bebidas fermentadas pela cultura mista e com o *L.acidophilus* promoveu a manutenção da viabilidade celular durante toda a vida de prateleira, enquanto essas bebidas sem adição de mel apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, B. X. **Avaliação físico-químico e microbiológica de méis não inspecionados comercializados no Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Universidade Estácio de Sá. 2003. 56 p. (Monografia, Bacharel em Ciências Biológicas).

AIZO, S. Setor de sucos atrai gigante sucro-alcooleira. **Engarrafador Moderno**, v. 8, n. 54, p. 8-10, 1997.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Açúcares funcionais galactooligossacarídeos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 10-14, 2004.

ALTERMANN, E.; et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 11, p.3906-3912, 2005.

ANDRIGHETTO, C.; GOMES, M. I. F. V. Produção de picolés utilizando leite acidófilo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p. 267-271, 2003.

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

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).

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **IX Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas**. Julho, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 14 set. 2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos**. Diário Oficial, Brasília, 03 dez. 1999. 1999 c.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 16 de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e/ou Novos Ingredientes.** Diário Oficial, Brasília, 03 dez. 1999. 1999 a.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 17 de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos.** Diário Oficial, Brasília, 03 dez. 1999. 1999 b.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde em sua Rotulagem.** Diário Oficial, Brasília, 03 dez. 1999. 1999 d.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 91 de 18 de outubro de 2000. **Aprova o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de alimento com soja.** Diário Oficial, Brasília, 20 out. 2000.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. **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>. Janeiro, 2001. Acesso em: 22 set. 2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 268 de 22 de setembro de 2005. **Aprova o Regulamento Técnico para produtos protéicos de origem vegetal.** Diário Oficial, Brasília, 23 set. 2005.

ANVISA. (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. **Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional.** Diário Oficial, Brasília, 26 dez. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9058>>. Acesso em: 26 de junho de 2013.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis.** 16. ed. Washington: AOAC, 1995. 1094 p.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4^a ed. 2001.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; et al. Probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT – Food and Science Technology*, v.40, p.669-675, 2007.

ARMSTRONG, J. S.; MORWITZ, V. G.; KUMAR, V. Sales forecasts for existing consumer products and services: do purchase intentions contribute to accuracy? *International Journal of Forecasting*, v.16, p. 383–397, 2000.

ARRABI, P. R. Alimentos funcionais - aspectos gerais. *Nutrire.*, v. 21, p. 87-102 , 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Análise sensorial de alimentos e bebidas -Terminologia– NBR 12806.** São Paulo: ABNT, 1993.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEM, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A (Ed.) **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects.** 3^a ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p.1-66.

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

BARBOSA, E. G., et al. Influência da adição de polpa de pêsegos antes e após a fermentação de extrato de soja com bactéria probiótica. 2º SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL. **Anais do simpósio.** Cascavel: CD-ROM, 2006.

BARBOSA, F. H. F.; et al. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus* sp. da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* – avaliação in vitro, ex vivo e in vivo em camundongos gnotoxênicos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, p. 1-8, 2006.

BARBOZA, L. M. V.; DE FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N. Desenvolvimento de produtos e análise sensorial. **Brasil alimentos**, n. 18, p 34-35, 2003.

BARRANGOU, R.; et al. Funcional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8957-8962, 2003.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.120, p. 119-126, 2003.

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).

BEHRENS, J. H.; DA SILVA, M. A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 431 - 439, 2004.

BEHRENS, J. H.; ROIG, S. M.; SILVA, M. A. A. P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Alimentaria**, v. 33, p.101 - 109, 2004.

BENEDETTI, A. C. E. P.; FALCÃO, D. P. Monitoramento da qualidade higiênico-sanitária no processamento do "leite" de soja na Unisoja, Araraquara, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23. P. 200-205. 2003.

BERNAL- MONDRAGON, O L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e probióticos**. 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).

BIZZARIA, D. K.; FILGUEIRAS, C. T. Análise microbiológica de mel de abelha consumido no município de Campo Grande - MS. **Higiene de Alimentos**, v. 17, p. 104-105, 2003.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Manual de laboratório de química dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995, p. 129.

BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite e Derivados**, v. 5, n. 25, p. 24-38, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia Alimentar para a População Brasileira** – Promovendo a Alimentação Saudável. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 210 p.

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. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. 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 17/06/2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 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 18/06/2013.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, nº 4, p. 373 - 380, 2007.

CAMARGO, R.C.R.; et al. **Produção de Mel**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/mel.htm#link4>>. Julho, 2003. Acesso em: 22 set. 2011.

CAMPOS, G.; et al. Classification of honey as floral or honeydew honey. **Food and Science Technology**, v. 23, p. 1-5, 2003.

CAMPOS, R. G. M. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. **Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra**, v. 11, n.2, p.17-47, 1987.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela, 1995.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulation Toxicology Pharmacology**, v. 30, p. 268-282, 1999.

CARPUSO, L.; FAVE, G. D.; MORELLI, L. Probiotics, prebiotics and new foods. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. S155, 2008.

CENTORBI, O. P., et al. Análisis bacteriológico e investigación de esporos de *Clostridium botulinum* em mieles. **Revista Argentina Microbiologia**, v.26, p. 96-100, 1994.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Review Food and Science Nutrition**, v. 45, p. 61 - 84, 2005.

CHARTERIS, W. P.; et al. Ingredient selection criteria for probiótica microorganisms in functional dairy foods. **International Journal Dairy Technology**, v. 51, p.123-136, 1998.

CHAUAN, S. K.; JOSHI, V. K.; LAL, B. B. Apricot-soy fruit-bar: a new protein-enriched product. **Journal of Food and Technology**, v.30, n.6, p. 457-458, 1993.

CHIARELLO, M. D. **Soja e os alimentos funcionais**. Brasília: Embrapa, 2002, 16 p.

CHICK, H.; SHIN, H. S.; USTUNOL, Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 478-481, 2001.

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

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.10525-10575, 1999.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1297-1303, 2004.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1983, 226p.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 353-261, 1996.

CRUZ, N. S.; et al. Soymilk treated by ultra high pressure homogenization: Acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 490-496, 2009.

CURDA, L.; PLOCKOVA, M. Impedance measurement of growth of lactic acid bacteria in dairy cultures with honey addition. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 727-733, 1995.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**. v. 7, p. 31- 41, 1996.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2804 - 2816, 1998.

DE ANGELIS, R. C. **Fome oculta: bases fisiológicas para reduzir seu risco**. São Paulo: Atheneu, 1999. 236 p.

DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; SILVA, A.L.S. Consumer attitude towards information on no conventional technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 43-49, 2003.

DELMAS, C., et al. Survey of honey for *Clostridium botulinum* spores in eastern. **Food Microbiology**, v.11, p.515-518, 1994.

DESAI, A. R.; SHAH, N. P.; POWELL, I. B. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. **Journal Dairy Science**. 2006; 89 (9): 3345-3351.

DIAS, J. **Determinação da vida de prateleira nos alimentos**. Disponível em: <http://www.hipersuper.pt/2007/01/19/Determina_o_da_Vida_de_Prateleir/>. Janeiro 2007. Acesso em: 25 set. 2011.

DOELLE, H. A. **Bacterial Metabolism**. New York: Academic Press, 1975.

DONKOR, O. N; et al. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 657- 665, 2007.

DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, p. 510-521, 2008.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 2ª ed. Curitiba: Champagnat, 2007.

ELLIS, M. J. **Shelf life evaluation of foods**. London: Black Academic & Professional, 1996. 321 p.

EMBRAPA. **Produção do mel**. Mel: definição e origem, composição e propriedades terapêuticas. Embrapa Meio norte, jul. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/mel.htm>. Acesso: 18 jun. 2013.

EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. **Journal Nutrition**, v.81, p.S1-S27, 1999.

EVANGELISTA, J. **Alimentos: um estudo abrangente**. São Paulo: Atheneu, 2005. 652p.

EVANGELISTA, S. R. **Estudo da fermentação e vida de prateleira de bebida simbiótica fermentada a base de soja**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. 2011. 105 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Alimentos).

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS); WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. 2006. Acesso em: 20 set. 2011.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS); WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Disponível em:

<http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. 2001. Acesso em: 20 set. 2011.

FELBERG, I; et al. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do Brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 163-174, 2004.

FELIS, G. E.; et al. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a gange in taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. **International Journal System Evolution Microbiology**. 2001; 51 (6): 2113-2117.

FERREIRA, C. L. L. F. Leite acidófilo: oito décadas de evolução. **Leite e derivados**, v.29, p. 22-26,1999.

FERREIRA, C. L. L.; TESHIMA, E. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.16, p. 22-25, 2000.

FERREIRA, V. L. P.; et al. Testes afetivos. In: **Análise Sensorial Testes Discriminativos e Afetivos**. Campinas: Profíqua, 1ª ed., 2000, p. 54-71.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy journal**, v. 9, p. 53-61, 1999.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. S39-S49, 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

FRANCO, B. D. G. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008, 182p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GARCIA G, M.; QUINTERO R., M.; LÓPEZ- MUNGUÍA C. A. **Biotecnologia Alimentaria**. México D.F: Editorial Limusa, 1993. 636 p.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of the human gut microbiota using the prebiotics oligofrutose and inulin. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1438-1441, 1999.

GIBSON, G. R. Non digestible oligosaccharides and bifidobacteria-implications for health. **International Sugar Journal**. v. 96, p.381-387, 1994.

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

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GILLILAND, S. E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L.; (Ed.) **Applied Dairy Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 327-343.

GODOY, R. C. B.; OLIVEIRA, A. C.; LEDO, C. A. Avaliação físico-química e sensorial de extrato hidrossolúvel de soja com polpa de manga. In: **VIII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, 2003, Curitiba. Anais, Curitiba: TecArt 2003. CD-ROM.

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

GOMES, J. C. **Legislação de alimentos e bebidas**. Viçosa: Editora UFV, 2009. 635p.

GONNET, M.; LAVIE, P.; LOUVEAUX, J. La pasteurization des miels. **Annals of Abeilles**, v. 7, p. 81 - 102, 1964.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 360, p. 512-518, 2003.

GUILLILAN, S. E.; SPEAK, M. L. Antagonistic action of *L. acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. **Journal of food protection**, v. 40, p. 820-823, 1977.

GURGEL, M. S. C. C. A.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação das características físico-químicas do iogurte. **Leite & Derivados**, São Paulo, v.4, n.22, p. 38-44, 1995.

HASLER, C. M. Functional Foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**., v. 52, n. 11, 1998.

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

HEANEY, R. P.; et al. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1166 - 1169, 2000.

HOLZAPFEL, W. H.; et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Journal Clinical Nutrition**, 2001; 73 (2) Suppl: 365S-373S.

HOLZAPFEL, W. H.; et al. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

HORN, H. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: **XI Congresso Brasileiro de Apicultura**, Teresina, 1996, p. 403-429.

HOU, J. W.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Internacional**, v. 33, p. 393 - 397, 2000.

HOVERSTAD, T. The normal microflora and short chain fatty acids. In: BENGTT AND GUSTAFSSON SYMPOSIUM, 5, 1988, Stockholm. **Summaries**...Sweden. 1988.

HUHTANEN, C. N.; KNOX, D.; SHIMANUKI, H. Incidence and origin of *Clostridium botulinum* spores in honey. **Journal of Food Protection**, v. 44, n.11, p. 812-814, 1981.

IFT (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS). Sensory evaluations guide for testing food and beverage products. **Food and Technology**, v. 35, p. 50 - 57, 1981.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 1ª. ed. digital. São Paulo: INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008. 1020p.

INSTITUTO DANONE RESEARCH. **Monografia Activia**. Disponível em: <http://www.danone.com.br/pdf/Monografia_Activia.pdf>. 2007. Acesso em: 20 set. 2011.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 6579. **Microbiology of food and animal feeding stuff**. Annex D: Detection of Salmonella spp. in animal faeces and environmental samples from primary stage, 2007.

ITO, K. A.; CHEN, J. K. Effect of pH on growth of Clostridium botulinum in foods. **Food Technology**, New York, v. 32, n.1, p. 71-76, 1978.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 6ª ed., 711p.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. (Ed.) **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998, p.357-381.

JUNEJA, V. K.; SNYDER, O. P.; MARMER, B. S. Potencial for growth from spores Bacillus cereus and Clostridium botulinum and vegetative cells of Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes and Salmonella serotypes in cooked ground beef during cooling. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 3, p. 272-275, 1997.

KAJIWARA, S.; GANDHI, H.; USTUNOL, Z. Effect of Honey on the Growth of and Acid Production by Human Intestinal Bifidobacterium spp.: An In Vitro Comparison with Commercial Oligosaccharides and Inulin. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 214-218, 2002.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal Pharmacy Science**, v.15, p.1-9, 2002.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal Bioscience**, v. 27, p. 703-714, 2002.

KAUTTER, D. A., et al. Clostridium botulinum spores in Infant foods: a survey. **Journal Food Protection**, v.45, n.11, p.1028-1029, 1982.

KEMPKA, A. P.; et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 170-177, 2008.

KLAENHAMMER, T. R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.) **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 2001. p. 797-811.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 295-306, 1998.

KOEHL, L.; et al. Intelligent sensory evaluation of industrial products for exploiting consumer's preference. **Mathematics and Computers in Simulation**, v.77, p. 522-530, 2008.

KOMATSU, R. T.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 329-347, 2008.

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).

KURMAN, J. A.; RASIC, J. **Encyclopedia of fermented fresh milk products**. New York: Van Nostrand Reinhold., 1992. p. 306- 307.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, p. 99-107, 2001.

LEE, Y. K.; et al. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LEITE, J. I. A.; ROSA, C. O. B. Alimentos funcionais e dislipidemias. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (Ed.) **Alimentos funcionais: benefícios para a saúde**. Viçosa: Editora UFV, 2008. p.161-184.

LEITE, J. M. C.; et al. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. **Food Chemistry**, v. 70, p. 93-98, 2000.

LEWIS, M.; DALE, R. H. Chilled yogurt and other dairy desserts. In: ELLIS, M. J. (Ed.) **Shelf life evaluation of foods**. New York: Blackie Academic & Professional, 1996. 321p.

LIU, K. **Soybeans chemistry technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532 p.

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

MACEDO, L. N. **Propriedades prebióticas e antimicrobianas de mel de abelha**. Seropédica/RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2007. 58 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

MACEDO, L. N.; et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 935-942, 2008.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Human Colonic Microbiota: Ecology, Physiology and Metabolic Potential of Intestinal Bacteria. **Scand Journal Gastroenterology**, v. 32, p. 3-9, 1997.

MACFIE, H. J.; et al. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order-carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, v. 4, p. 129 - 148, 1989.

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

MACLEOD, G.; AMES, J. Soy flavor and its improvement. **CRC Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.27, p.219 - 401, 1988.

MAIA, M. J. L.; ROSSI, E. A.; CARVALHO, M. R. B. Qualidade e rendimento do "leite" de soja da Unidade de Produção de Derivados de Soja – UNISOJA – FCF – Araraquara/UNESP. **Alimentos e nutrição**, v.17, p.65-72, 2006.

MARAZZA, J. A.; GARRO, M. S.; GIORI, G. S. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. **Food Microbiology**, v. 26, p. 333-339, 2009.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. **Journal of Dairy Research**, v. 50, p. 375-379, 1983.

MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **Brazil Journal Nutrition**, v. 87, p. S153-S157, 2002.

MATTILA-SANDHOLM, T.; et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173-182, 2002.

MEILGAARD, M. R.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4^a ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, 448p.

MIDURA, T.F. et al. Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.9, n.2, p.282-283, 1979.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia Alimentar para a População Brasileira**. Brasil: Ministério da Saúde, 2005, 217 p. 2005 a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição**. Brasil: Ministério da Saúde, 2005, 48 p. 2005 b.

MODLER, H. W. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v. 4. p. 383 - 407, 1994.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8^a ed. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1993. 93p.

MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B. de. Glicídios no mel. **Química nova**, v. 24, n. 4, p. 516 – 525, 2001.

MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M. **Reações de Transformação e Vida de Prateleira de Alimentos processados**. Manual Técnico nº6. Terceira edição. Campinas: ITAL, 2004, 92 p.

NAHAISI, M. H. Lactobacillus acidophilus: therapeutic properties, products and enumeration. In: ROBINSON, R. K. (Ed.) **Developments in Food Microbiology**. Londres: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p. 153-178.

NICOLI, J. R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia**, v. 15, p. 183-190, 1995.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos y simbióticos: Moduladores Del sistema digestivo. **Ciencia Hoy**, v. 13, p. 39-43, 2003.

NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal Nutrition**, v.129, p.1402S-1406S, 1999.

O'SULLIVAN, D. J.; KULLEN, M. Tracking of Probiotic Bifidobacteria in the Intestine. **International Dairy Journal**, v.8, p.513-525, 1998.

OBERMAN, H. **Traditional Fermented Milk Products**. London, England: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. 234p.

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

OLIVEIRA, N. O.; et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.1, 2002.

PAMPLONA, B. C. **Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas**. São Paulo: Instituto de Biologia da USP. 1989. 131 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas).

PATEL, A. A.; WAGHMARE, W. M.; GUPTA, S. K. Lactic Fermentation of Soymilk – A review. **Process Biochemistry**, p. 9-13, 1980.

PENNA, F. J.; et al. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 76, p.S209-S217, 2000.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional**. São Paulo: Metha, 2002. 135 p.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14.ed. Nobel: Piracicaba, 2000. 476 p.

PINEIRO, M.; et al. FAO technical meeting on prebiotics. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. s156-s159, 2008.

PINHEIRO, A. S. **Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. 2002. (Tese, Doutorado em Engenharia de Alimentos).

PIRES, C. E. T. **Principais bactérias presentes em doenças transmitidas por alimentos (DTAs)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 2011. 118p. (Graduação em Medicina Veterinária).

PIZARRO, C. A. C. **Avaliação de melão minimamente processado armazenado em diferentes temperaturas e embalagens**. Campinas: Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP. 2003. 81p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Agrícola – Tecnologia pós-colheita).

PONTES, M. M. M. **Polpa de manga processada por alta pressão hidrostática: aspectos microbiológicos, nutricionais, sensoriais e a percepção do consumidor**. Seropédica: Instituto de Tecnologia da Universidade Estadual Rural do Rio de Janeiro. 2008. 136p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. **Industrial Microbiology**. New York: McGraw- Hill, 1957.

RACOWSKI, I.; et al. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. **Revista Analytica**, v. 30, 2007.

RAGAZANI, A. V. F.; et al. Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializado no Estado de São Paulo e em outros estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p. 396 - 399, 2008.

RALL, V. L. M., et al. Incidência de esporos de *Clostridium botulinum* e análise da qualidade microbiológica do mel no estado de São Paulo. In: **CONGRESSO**

BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, 2001, Foz do Iguaçu, PR. Anais... Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.403.

RASTALL, R. A.; et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 145-152, 2005.

ROBERFROID, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1660S-1664S, 2000.

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **American Journal Clinical Nutrition**, v.73, p. 406-409, 2001.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal Nutrition**, v. 129, p.1398S-1401S, 1999.

ROBINSON, R. **Therapeutics properties of fermented milks**. England: Elsevier, 1991. 185 p.

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

ROSA, A. M.; et al. Alimentos fermentados à base de soja (*Glycine max* (Merril) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados à isoflavonas e seus açúcares. **Revista Brasileira de Biociência**, v.7, p. 454-462, 2009.

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.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-6, 2006.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011, 669p.

SAARELA, M; et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SALGADO, J. M. Impacto dos alimentos funcionais para a saúde. **Revista Nutrição em Pauta**, v. 48, p.10-17, 2001.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **The Journal of Pediatrics**, v. 149, p. S115-S120, 2006.

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

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

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

SANZ, M. L.; SANZ, J.; MARTINEZ, C.I. Gás chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. **Journal of Chromatography A.**, n. 1059, p. 143-148, 2004.

SCALABRINI, P.; et al. Characterization of *Bifidobacterium* stains for use in soymilk fermentation. **International Journal or Food Microbiology**.v. 39. p. 213- 219. 1998.

SCHONS, P. F., et al. Avaliação de bebida de soja fermentada com micro-organismos probióticos durante o armazenamento. 2º SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL. **Anais do simpósio**. Cascavel: CD-ROM, 2006.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and symbiotics – approaching a definition. **American Journal Clinical Nutritional**, v. 73, p. 3615-3645, 2001.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **International Dairy Journal**, v.7, p. 349-356, 1997.

SHIMAKAWA, Y.; et al. Evaluation of *bifidobacterium breves* strain Yakult-fermented sowmilk as a probiotic food. **International Journal Food and Microbiology**, v. 81, p. 131-136, 2003.

SHIN, H. S. USTUNOL, Z. Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: an in vitro comparison. **Food Research International**. 38, p. 721-728, 2005.

SILVA, K. M. C.; et al. Soja (*Glycine max*): benefícios à saúde humana com melhor qualidade de vida. In: **IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, 2009, Pernambuco. Resumos... Pernambuco: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 2009.

SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 68-69, p. 41-50, 2000.

SILVA, R. A.; et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 113-120, 2006.

SNELLING, A. M. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 18, p. 420-426, 2005.

SOUZA, G. Fatores de qualidade do iogurte. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.21, p. 20-27, 1990.

STANTON, C.; et al. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E. R. (Ed.) **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 27-58.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal Food and Microbiology**, 36, p. 1-29.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 3. ed. New York/London: Academic Press, 2004. 377p.

STONOGA, V. I.; FREITAS, R. J. S. D. Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas. **Bd. Ceppa**, v.9, p. 9-16, 1991.

SUGIYAMA, H. et al. Number of *Clostridium botulinum* spores in honey. **Journal Food Protection**, v.41, n.11, p.848-850, 1978.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: Ciencia y tecnologia**. 1ª ed. Zaragoza: Acribia, 1991, p. 368.

TAMIME, Y.; ROBINSON, R. **Yogurt: science and technology**. 2ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001, p. 358- 359, 366- 367.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Reviews Nutrition**, v. 22, p. 107-138, 2002.

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

TORRES - PENARANDA, A. V.; et al. Sensory characteristics of soymilk and tofu made from lipoxygenase-free and normal soybeans. **Journal of Food Science**, v. 63, p.1084 - 1087, 1998.

TUOHY, K. M.; et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today, Haywards Heath**, v. 8, p. 692-700, 2003.

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.

VALIM, M. F.; et al. Sensory acceptance of a functional beverage base don orange juice and soymilk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n.2, p. 153-156, 2003.

VARGA, L. Effect of acácia (*Robinia pseudo-acacia* L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p.272-275, 2006.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VÁSQUEZ, A.; et al. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **System Applied Microbiology**, 2005; 28 (5): 430-441.

VILLALUENGA, C. M.; et al. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p.768-774, 2006.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, p. 497- 505, 1999.

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

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

WGO (World Gastroenterology Organisation). **Probiotics and Prebiotics**. Disponível em:

<http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics.pdf>. Maio, 2008. Acesso em: 20 set. 2012.

WILLIAMSON, C. Functional foods: What are the benefits?. **British Journal of Community Nursing**, v. 14, p. 230-236, 2009.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.

ZETTERSTROM, R.; et al. Early infant feeding and micro-ecology of the gut. **Acta Paediatrica**, v. 36, p. 557-562, 1994. Acesso em: 10 de março de 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FICHA TÉCNICA DO EXTRATO DE SOJA EM PÓ PROVESOL®

Extrato de Soja - Provesol SM-N

MARCA: PROVESOL SM-N

DESCRIÇÃO

PROVESOL SM-N é um extrato protéico obtido a partir da emulsão aquosa dos grãos descorticados de soja (não modificada geneticamente), submetido a tratamento térmico adequado para inativação dos fatores antinutricionais e microbiológicos. A fração solúvel é concentrada e, em seguida, seca por processo de *spray-drying*, resultando em um ingrediente funcional, de alto valor nutritivo. Apresenta-se em forma de pó fino, de cor amarela clara e solúvel em água. É isento de ingredientes adicionais e quaisquer aditivos químicos. Também isento de lactose, sacarose, caseína e glúten. Devido a suas características, pode ser utilizado em iogurtes, tofu e sobremesas.

APLICAÇÕES

- Fermentados de soja sabor iogurte
- Tofu
- Sobremesas

BENEFÍCIOS

- Extrato de soja integral que apresenta alto índice de gorduras insaturadas, sendo rico em ômega-3 e ômega-6
- Substituir, nestas aplicações, o leite animal
- 100% vegetal
- Isento de lactose
- Produto não transgênico
- Alta solubilidade em água à temperatura ambiente (20°C - 40°C)
- Sabor neutro
- Adequado para fermentações por possuir açúcares probióticos como a rafinose e estaquiose e proporcionar um sabor diferenciado

COMPOSIÇÃO

- Extrato de soja em pó

DOSAGENS INDICATIVAS

- Fermentados de soja sabor iogurte: 6,0 - 8,0%
- Tofu: 5 - 10%
- Sobremesas: 5 - 10%

INSTRUÇÕES DE USO

Para aplicação deste produto sugerimos o contato com nossa equipe técnica de aplicação de produtos.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS E NUTRICIONAIS

COMPOSIÇÃO APROXIMADA DE PRODUTO	100g		%VD (1)
	20g (2 colheres de sopa)		
Valor energético	486kcal	97kcal	5%
Carboidratos	18,5g	3,7g	1%
Proteína	44g	8,8g	12%
Gorduras totais	26g	5,2g	9%
Gorduras saturadas	3,9g	0,8g	4%
Gorduras trans	zero	zero	**
Colesterol	zero	zero	zero
Fibra alimentar	1,5g	0,3g	1%
Sódio	36mg	zero	zero
Cálcio	127mg	25mg	3%

*VD: Valor Diário de Referência com base em uma dieta de 2000kcal ou 8400kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores, dependendo das suas necessidades energéticas. **VD não estabelecido.

Umidade	máx. 4,5%
Cinzas	máx. 6%

PADRÕES MICROBIOLÓGICOS

Contagem padrão em placas	máx. 5 x 10⁴ UFC/g
Coliformes totais	máx. 50 NMP/g
Coliformes fecais	máx. 10 NMP/g
Bacillus cereus	máx. 5 x 10² UFC/g
Salmonella	ausência em 25g
Bolores e leveduras	máx. 1 x 10³ UFC/g

PROPRIEDADES

Forma	Pó
Cor	Creme
Sabor e odor	Neutro
Solubilidade	Solúvel em água à temperatura ambiente

FUNCIONALIDADE

EMBALAGEM
PROVESOL SM-N é acondicionado em saco de papel Kraft multifolhado e revestido internamente com saco de polietileno. Peso líquido: 25kg.

ARMAZENAMENTO
PROVESOL SM-N deve ser estocado em sua embalagem original, sobre estrados em local seco e ventilado. Manter a embalagem corretamente fechada, quando não estiver em uso.

PRAZO DE VALIDADE
09 (nove) meses.

Divisão Industrial - Ingredientes Funcionais de Soja - Aplicação de Produtos - Fone 51 3499.9066



LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E
LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL E ESTUDOS DE CONSUMIDOR

CONVIDAMOS A TODOS A PARTICIPAR DA 2ª SESSÃO DOS TESTES SENSORIAIS DE ACEITAÇÃO DE BEBIDA A BASE DE SOJA

Público alvo: todos da comunidade UFMG que não tenham aversão a produtos de SOJA e que não apresentem restrição à ingestão de mel. **Quem participou na semana passada, é importante que retornem e participem novamente.**

Testes: início 08 de abril, de segunda à sexta de 08:30h às 16:00h.

Local: Laboratório de Análise Sensorial da FAFAR (sala 3102, 3º andar, Bloco 3).

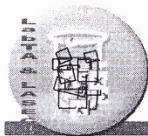
Duração do teste: 5 minutos

Brinde pela participação: chocolates Batom e Bis (hummm!) 😊

A SUA PARTICIPAÇÃO É MUITO IMPORTANTE PARA NOS! OBRIGADA!



APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E
LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL E ESTUDOS DE
CONSUMIDOR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISAS COM SERES HUMANOS DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS FERMENTADAS PROBIÓTICAS À BASE DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA ADICIONADAS DE MEL DE ABELHA

Orientadoras: Prof^a Evelyn de Souza Oliveira Lopes e Prof^a Inayara Cristina Alves Lacerda
(DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS/FACULDADE DE FARMÁCIA/UFMG)

Aluna de Pós-Graduação: Roberta Figueiredo Resende Riquette (Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
PPGCA/UFMG)

A soja e seus derivados vêm apresentando grande relevância no mercado, pois o grão é considerado fonte de diversos nutrientes e vitaminas, proporcionando diversos benefícios à saúde. Entretanto, possuem baixa aceitação entre os brasileiros devido ao aroma e sabor considerados desagradáveis. A partir disso, a fermentação tem sido muito utilizada no desenvolvimento de produtos derivados da soja sendo o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) a principal matéria prima utilizada para a produção de leites fermentados, por se tratar de um alimento rico em nutrientes que estimulam o crescimento de micro-organismos. Dessa forma, o desenvolvimento de bebidas fermentadas no EHS, com culturas probióticas e acrescidas de prebióticos, torna-se opção interessante para consumidores que buscam alimentos saudáveis e nutritivos.

Podem participar desta pesquisa pessoas que não apresentem aversão a produtos à base de soja e mel de abelha e não possuam nenhuma restrição de saúde que impossibilite o consumo desses alimentos.

Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalização, sem necessidade de justificativa, devendo, no entanto, comunicar sua desistência à equipe responsável pela pesquisa. Todos os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantido o sigilo das informações e a sua privacidade.

A SUA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO TEM CARÁTER VOLUNTÁRIO E NÃO LHE TRARÁ NENHUM TIPO DE ÔNUS OU REMUNERAÇÃO. Desde já agradecemos sua valiosa colaboração.

Prof^a Evelyn de Souza Oliveira Lopes: (31) 3409-6915

Prof^a Inayara Cristina Alves Lacerda: (31) 3409-6917

Evelyn de S. Oliveira Lopes

Inayara C. Lacerda

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Avenida Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II 2º andar, sala 2005 / Campus Pampulha 31270-901 / Belo Horizonte, MG - Brasil

Telefax: (31) 3409-4592/4027

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Compreendi e concordo com as informações que me foram transmitidas e, portanto, aceito participar como voluntário neste projeto de pesquisa. Declaro, ainda, que recebi cópia do presente termo de compromisso.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Telefone de contato: _____

E-mail: _____

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO



LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E
LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL E ESTUDOS DE CONSUMIDOR

1

NÚMERO PROVADOR: _____

ESTUDO SOBRE BEBIDA FERMENTADA À BASE DE SOJA

Caso tenha concordado em participar deste projeto, por favor, complete o questionário com todas as informações solicitadas, as quais serão mantidas confidenciais. Desde já agradecemos sua colaboração.

Nome:		
Telefone: ()	()	E-mail:

Gênero masculino feminino

Idade 16-25 26-35 36-45 46-55 56-65 ≥ 66 anos

Escolaridade

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental incompleto | <input type="checkbox"/> Superior incompleto |
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental completo | <input type="checkbox"/> Superior completo |
| <input type="checkbox"/> Ensino Médio incompleto | <input type="checkbox"/> Pós-graduação: Especialização |
| <input type="checkbox"/> Ensino Médio completo | <input type="checkbox"/> Pós-graduação: Mestrado/Doutorado |

Profissão:

Renda familiar mensal

- 01 a 04 salários mínimos
 > 05 a 09 salários mínimos
 > 10 a 19 salários mínimos
 > 20 a 29 salários mínimos
 ≥ 30 salários mínimos

Você está fazendo uso de algum medicamento?

sim não Qual (is)?

Você está seguindo alguma dieta especial?

sim não Qual?

Você tem alguma restrição de saúde que impossibilite ou torne não recomendado o consumo de bebidas à base de soja com mel de abelha? ²

sim não **Qual (is)?**

Você já experimentou alguma bebida à base de soja?

sim não **Qual (is)?**

Assinale abaixo os momentos que você associa ao consumo de bebidas à base de soja. (Obs: você pode marcar quantas opções quiser)

café da manhã lanche da manhã almoço outros: _____
 lanche da tarde jantar lanche da noite

Você gosta de ingerir bebida à base de soja? Indique o quanto você gosta ou desgosta deste produto.

gosto muito gosto moderadamente indiferente desgosto moderadamente nunca

Com que frequência você consome bebidas à base de soja?

diariamente frequentemente eventualmente raramente nunca

Qual é a sua preferência de consumo de bebidas à base de soja? (Obs: você pode marcar quantas opções quiser)

Sucos (ex: Ades) "Leite de soja" (Ex: Ades) Fermentado de soja Outros: _____
(ex: "iogurte de soja")


Você costuma observar a embalagem e o rótulo da bebida à base de soja que consome?

sempre frequentemente eventualmente raramente nunca

O que você costuma observar e/ou procurar na embalagem e no rótulo das bebidas à base de soja? (Obs: você pode marcar quantas opções quiser)

marca Alegação de propriedades funcionais
 data de fabricação/prazo de validade preço
 tabela de informação nutricional informações sobre a composição (ingredientes)
 informações sobre a denominação/tipo de soja informações sobre conservantes (aditivos)
 alegações de benefícios à saúde informações sobre a tecnologia de fabricação
 informações sobre o fabricante da bebida outras: _____

APÊNDICE E – MODELO DA FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

	LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL E ESTUDOS DE CONSUMIDOR			
Sessão: 2ª	Amostra: 256	Provedor:		
Nome: _____				
<p>Você está recebendo uma amostra codificada de uma bebida fermentada à base de soja. Por favor, <u>observe</u> o produto e avalie-o quanto à aparência e marque na escala um traço vertical em qualquer ponto da reta, indicando a posição que melhor representa a sua resposta. Em seguida <u>cheire</u> a amostra e repita o mesmo procedimento anterior para avaliar o aroma do produto. <u>Prove</u> a amostra e repita o mesmo procedimento para avaliar o seu sabor e a sua consistência.</p>				
APARÊNCIA	Desgostei muitíssimo _____ Gostei muitíssimo			
AROMA	Desgostei muitíssimo _____ Gostei muitíssimo			
SABOR	Desgostei muitíssimo _____ Gostei muitíssimo			
CONSISTÊNCIA	Desgostei muitíssimo _____ Gostei muitíssimo			
<p>Com base em sua opinião sobre esta amostra, marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação à impressão global (aparência, aroma, sabor e consistência).</p>				
Desgostei muitíssimo _____ Gostei muitíssimo				
<p>Com base em sua opinião sobre esta amostra, indique na escala abaixo sua intenção de compra. Qual seria sua atitude de compra em relação a esta bebida fermentada à base de soja?</p>				
<input type="checkbox"/> Certamente não compraria	<input type="checkbox"/> Possivelmente não compraria	<input type="checkbox"/> Talvez comprasse, talvez não comprasse	<input type="checkbox"/> Possivelmente compraria	<input type="checkbox"/> Certamente compraria
Comentários: _____				

APÊNDICE F – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA PESQUISA

TABELA 4 – Delineamento experimental para o estudo da vida de prateleira das bebidas fermentadas à base de extrato hidrossolúvel de soja.

Causa de variação	G.L (grau de liberdade)	Q.M (quadrado médio)
Blocos	2	
Variedades (V)	5	QMV
Resíduos (a)	10	QMR (a)
(Parcelas)	(17)	
Tempo (E)	4	QME
Interação (V x E)	20	QMV x E
Resíduo (b)	48	QMR (b)
Subparcelas	89	

APÊNDICE G – RESULTADOS DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO MEL



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO N^o CQ 8392/2012MB

MATERIAL: Mel Santa Bárbara, Lote 237, Fabricação 24/08/2012, Validade 24/08/2014

INTERESSADO: Roberta Figueiredo Resende Riquette

ENDEREÇO: Rua Caldas, 222/202, Carmo Sion, Belo Horizonte (MG)

DATA DE RECEBIMENTO DA(S) AMOSTRA(S): 30/11/2012

DATA DE ANÁLISE: 03/12/2012

DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO: 10/12/2012

NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): Microbiológica

RESPONSÁVEL(EIS): Margarete Okazaki

1. MÉTODO(S)

DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.


2. RESULTADO(S)

Determinação	Repetição	Resultado
Esporos de bactérias mesófilas anaeróbias (em 4g)	1	ausente
	2	ausente
	3	ausente


3. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. b) Este relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial.

Visto:


Valéria C. A. Junqueira

Diretor Técnico de Serviço
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia


Margarete Okazaki

Pesquisador Científico
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia



CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS
Av. Brasil, 2880 • CEP 13.070-178 • Campinas/SP • Brasil
Tel. 19 3743-1781/1810/1786 • Fax 19 3242-4585
email: ccqa@ital.sp.gov.br
http://www.ital.sp.gov.br



APÊNDICE H – VARIAÇÃO DA ACIDEZ DURANTE A FERMENTAÇÃO

TABELA 10 - Variação da acidez total titulável (ATT), em % de ácido láctico, em função do tempo das bebidas fermentadas pelo *L.acidophilus* e *L.acidophilus* com *L.casei*, sem a adição do mel de abelha.

Tempo (horas)	Acidez (% de ácido láctico)	
	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.acidophilus</i> + <i>L.casei</i>
0	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00
2	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00
4	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,01
6	0,20 ± 0,00	0,17 ± 0,01
8	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,01
9,5	0,37 ± 0,01	-
10	-	0,35 ± 0,01

TABELA 11 - Variação de pH e acidez total titulável (ATT), em % de ácido láctico, em função do tempo das bebidas fermentadas pelo *L. casei* sem a adição do mel de abelha.

Tempo (horas)	<i>L.casei</i>	
	pH	Acidez
0	6,67 ± 0,01	0,09 ± 0,01
16	5,96 ± 0,04	0,16 ± 0,03
18	5,34 ± 0,05	0,23 ± 0,02
20	4,89 ± 0,04	0,32 ± 0,04
22	4,70 ± 0,06	0,35 ± 0,02
24	4,55 ± 0,06	0,36 ± 0,05
25	4,48 ± 0,01	0,37 ± 0,05

APÊNDICE I – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA/ UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Projeto: CAAE –07508213.4.0000.5149

Interessado(a): Profa. Evelyn de Souza Oliveira Lopes
Departamento de Alimentos
Faculdade de Farmácia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de abril de 2013, o projeto de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento de bebidas fermentadas à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionadas de mel de abelha"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

APÊNDICE J – VARIAÇÕES DA ACIDEZ E DA CONTAGEM MICROBIOLÓGICA DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DAS BEBIDAS FERMENTADAS

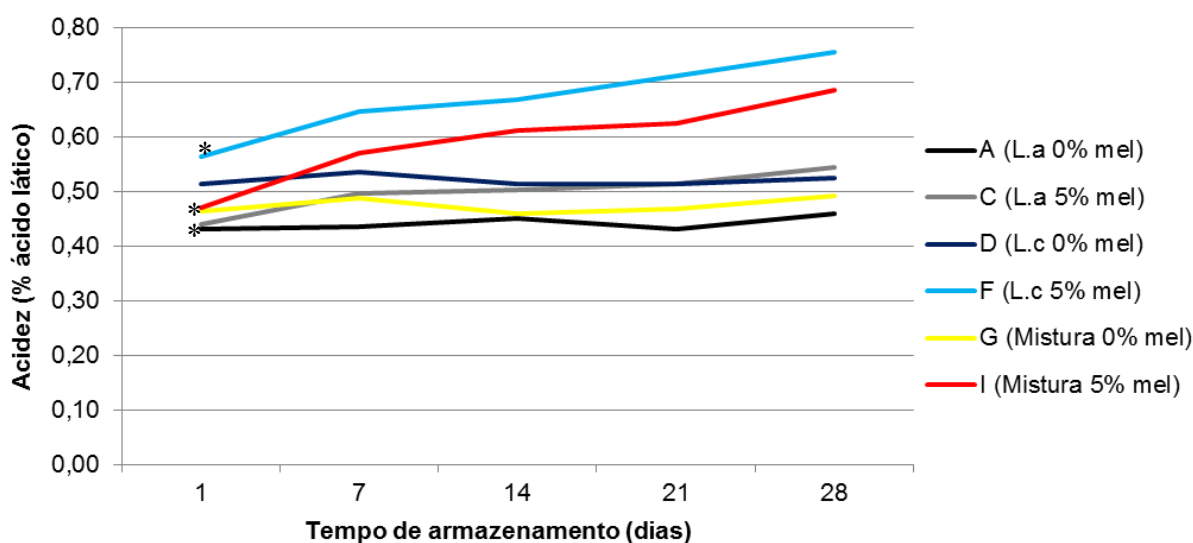


FIGURA 16 - Alteração da acidez durante os 28 dias de armazenamento das bebidas fermentadas (A, C, D, F, G e I). (*) Indica que há diferença estatística entre os dias analisados ($p < 0,05$).

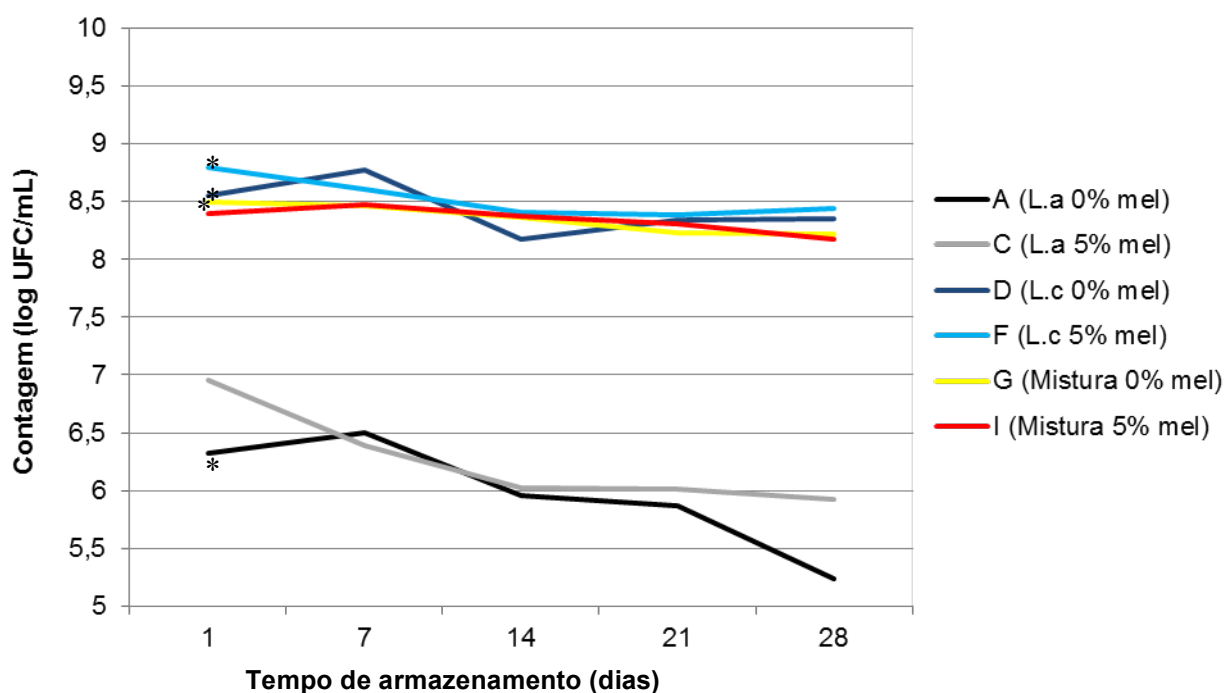


FIGURA 17 – Contagem de células viáveis das bebidas fermentadas durante os 28 dias de armazenamento. (*) Indica que há diferença estatística entre os dias analisados ($p < 0,05$).