UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

THIANA CLAUDIA FREIRE ESTEVES

DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTO FERMENTADO DE SOJA TIPO "IOGURTE": AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA.

Rio de Janeiro

Março de 2011

THIANA CLAUDIA FREIRE ESTEVES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dra. Maria Alice Zarur Coelho
Co-orientador: Prof. Dra. Maria Helena Rocha-Leão

Rio de Janeiro

Março de 2011

THIANA CLAUDIA FREIRE ESTEVES

Desenvolvimento de alimento fermentado de soja tipo "iogurte": avaliação da estabilidade física.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

Orientadores

_____

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

_____

Maria Helena Rocha-Leão, D.Sc.

Banca Examinadora

_____

Sandra Regina Gregorio, D.Sc.

_____

Ilana Felberg, D.Sc.

_____

Karen Signori, D.Sc.

Rio de Janeiro

Março de 2011

Ficha Catalográfica

Esteves, Thiana Claudia Freire

Desenvolvimento de alimento fermentado de soja tipo "iogurte": avaliação da estabilidade.

[Rio de Janeiro] – 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2011.

Orientador: Prof. Dra. Maria Alice Zarur Coelho
Co-orientador: Prof. Dra. Maria Helena Rocha-Leão

1.Extrato hidrossolúvel de soja.2.Extrato hidrossolúvel fermentado de soja.3.Emulsões.4.Hidrocolóides. – I. Título II. Universidade Federal do Rio de Janeiro- EQ. III- Série

“Você pode sempre sonhar, e seus sonhos se tornarão realidade,
mas é você que tem que torná-los realidade”.

Michael Jackson

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos que construíram este caminho comigo. Agradeço especialmente:

À Deus pela minha vida, por tudo que tenho e especialmente por quem eu tenho.

À minha mãe, por seu amor e apoio incondicionais, por estar sempre ao meu lado de maneira única e insubstituível, por ser o anjo da guarda mais perfeito que Deus poderia me dar.

Ao meu pai pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos.

Ao meu irmão e melhor amigo por fazer-se tão presente mesmo estando quase sempre em terras distantes.

À minha cunhada pelo carinho e torcida.

Aos meus avós pela dignidade e amor com que construíram nossa família.

Às minhas queridas afilhadas Brenda Fernanda e Juliana, sempre fonte de alegria e orgulho para mim.

Às minhas tias Fátima, Marilene e Zilda, meus padrinhos Américo e Sueli, minhas primas Flávia e Thaís, demais tios e primos que sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha orientadora Maria Alice pela oportunidade oferecida, pelo apoio, compreensão e carinho.

À minha co-orientadora Maria Helena pelo apoio e contribuição profissional.

À Ecobras, em especial Sr. Paulo e D. Paula, pelos anos de grande aprendizado profissional e, principalmente, pela amizade e confiança. À Catia, Rose, Rafaela, Luciana, Roberta, Mateus, Ismael, Lucas e todos que tornaram minha passagem pela Ecobras tão especial.

Às minhas queridas amigas e parceiras de trabalho Mariana e Roberta, que incansavelmente doaram seu tempo e competência em colaboração com esta pesquisa. Este trabalho não seria o mesmo sem vocês. Minha eterna gratidão.

À professora Sandra Gregório, por acreditar em mim desde o início da vida acadêmica, pelos conselhos e pela preciosa amizade. Sua energia e determinação são fontes de inspiração para mim. À pesquisadora e amiga Ilana Felberg com quem tive a oportunidade de trabalhar em cooperação e a quem admiro pela integridade e profissionalismo. Às professoras Djalva da Nóbrega, Denise Perdomo e todos os mestres e profissionais que muito contribuíram para minha formação.

À Fabiana, minha amiga de faculdade e de vida, por sempre me ouvir e encorajar. Às minhas irmãs Daniele e Fernanda Pestana pelo seu amor e apoio, e a todos os meus amigos pelo carinho, compreensão, torcida e por tornarem tudo sempre melhor.

Ao André, Ariana, Gisele, Kelly, Mariana, Priscilla, Roberta, Tatiana e todos os amigos do laboratório 103 pelas colaborações ao longo do caminho e pela amizade.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

RESUMO

O crescente interesse das pessoas por alimentos saudáveis têm impulsionado a indústria alimentícia a desenvolver novos produtos com propriedades benéficas à saúde, além das funções básicas de nutrição e satisfação do paladar. Dentre estes alimentos ditos "funcionais" a soja e os probióticos têm recebido especial atenção. Também os alimentos orgânicos ganham destaque no cenário de saudabilidade e sustentabilidade. Acompanhando estas tendências, a empresa *Ecobras* desenvolveu um produto tipo "iogurte de soja", o qual é obtido pela fermentação do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) com bactérias láticas e probióticos. O extrato hidrossolúvel fermentado de soja (EHFS) é uma emulsão do tipo óleo em água, com a fase contínua constituída por uma dispersão de proteínas complexas. Neste tipo de emulsão está presente uma série de processos de instabilidade e a caracterização e o controle desses processos são aspectos-chave na formulação de produtos comerciais. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabilizar o EHFS produzido pela *Ecobras* com o uso de hidrocolóides permitidos para uso em orgânicos, avaliar a influência dos mesmos sobre a viabilidade da cultura fermentativa e caracterizar o processo de fermentação pelo consumo de açúcares da soja e formação de ácido lático. Foram escolhidos quatro hidrocolóides de amplo uso na indústria de alimentos: carragena, goma guar, goma xantana e alginato de sódio que, em uma primeira etapa foram testados isoladamente em diferentes concentrações. Os resultados foram avaliados por análise visual e análise digital de imagens. Visualmente foi possível observar que a carragena e o alginato de sódio não foram capazes de estabilizar o EHFS. Os ensaios acrescidos de goma xantana e goma guar não apresentaram separação de fases durante o tempo de armazenamento de 30 dias. A análise digital de imagem das amostras acrescidas de goma guar, de goma xantana e um controle (sem adição de gomas), confirmou os resultados obtidos visualmente. Um planejamento fatorial do tipo 2^2 foi realizado utilizando combinações de goma guar e goma xantana em concentrações que variaram de 0,18% a 0,32%. Visualmente, apenas a amostra controle (sem adição de goma) apresentou separação de fases durante o período de estudo de 25 dias. Entretanto, por análise digital de imagem, foi possível observar o aumento do diâmetro médio das micelas e o ajuste aos modelos linear e exponencial indicando a existência de processo de desestabilização por difusão molecular e coalescência para os ensaios contendo 0,20% de goma guar + 0,20% de goma xantana e 0,30% de goma guar + 0,20% de goma xantana. É possível que esta desestabilização não tenha sido observada visualmente em função do impedimento estérico causado pelas gomas quando em altas concentrações, dificultando a separação das fases. Para caracterizar o processo de fermentação do EHFS, a quantificação dos açúcares da soja (glicose, sacarose, rafinose e estaquiose) e de ácido lático foi realizada no extrato de soja antes e depois da fermentação, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Como resposta houve um consumo de 17% de rafinose, 50% de glicose, 49% da sacarose e uma produção de 0,75 g de ácido lático por 100 g de produto, apresentando o produto final uma acidez de 0,83% em ácido lático, valor em acordo com o padrão de identidade e qualidade (PIQ) de leites fermentados. Também de acordo com o PIQ de leites fermentados, estes devem ter contagem mínima de 10^6 UFC/g. Assim, foi estuda a viabilidade das bactérias láticas no EHFS sem adição de gomas e no EHFS contendo quantidades crescentes de gomas xantana e guar durante o tempo de armazenamento de 30 dias. Após o

período de análise todas as amostras tiveram contagem na ordem de 10^6 UFC/g, estando dentro dos padrões estabelecidos para este categoria de produtos e não foi verificada influência da quantidade de goma na viabilidade da cultura lática uma vez que os ensaios acrescidos de gomas apresentaram comportamento semelhante ao controle. Conclui-se então que é possível a produção de EHFS estabilizado utilizando concentrações adequadas de goma guar e goma xantana e que este produto atende os regulamentos de acidez e viabilidade da cultura lática postulados pelo PIQ de leites fermentados.

ABSTRACT

The growing interest for healthy food has fostered the food industry to develop new products with other beneficial properties, beyond the basic nutritional and taste characteristics. Among these so called “functional food”, soy and probiotics have gained special attention. Organic food has also gathered much attention in the scenario of healthiness and sustainability. Following these trends, the company *Ecobras* developed a product, sort of “soy yougurt”, which is obtained by the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and probiotics. The fermented soymilk is an oil-on-water type emulsion, where the continuos phase is made of a dispersion of complex proteins. In this kind of emulsion there are a series of unstable processes and the characterization and control of such processes are key aspects in the formulation of commercial products. Therefore, the objective of this work was to stabilize the fermented soymilk produced by Ecobras by using hidrocolloids sanctioned for use in organic food, evaluate their influence over the viability of the fermentative culture and characterize the fermentation process through the consumption of soy sugars and the production of lactic acid. Four hidrocolloids of ample use in the food industry were chosen: carrageen, guar gum, xantham gum and sodium alginate which were initially tested isolated in different concentrations. The results were evaluated through visual analysis and digital image processing. Visually, it could be observed that the carrageen and the sodium alginate were not able to stabilize the fermented soymilk. The trials where xantham gum and guar gum were added did not show phase separation during 28 days of storage. The digital image processing of the samples where guar guam or xantham gum were added, as well as a control (where no gums were added), confirmed the results obtained visually. A 2^2 type design was conducted using combinations of guar gum and xantham gum in concentrations ranging from 0.18% to 0.32%. Visually, only the control sample (without gum) showed phase separation during the 25 days of study. However, through digital image processing it was possible to observe the increase in the average diameter of the droplets, and the adjustment of the linear and exponential models indicated the existence of a destabilization process by molecular diffusion and coalescence for the trials containing 0.20% of guar gum + 0.20% of xantham gum and 0.30% of guar gum + 0.20% of xantham gum. This visual impediment might have been a result of steric impediment caused by high concentration of the gums, making it difficult to see the separation of phases. To characterize the fermentation process of fermented soymilk, the quantification of soy sugars (glucose, sucrose, raffinose and stachyose) and lactic acid was performed in the soy extract before and after fermentation using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). As a result, 17% of raffinose, 50% of glucose, 49% of sucrose were consumed and 0.75g of lactic acid were produced per 100g of the product. The final acidity was of 0.83% in terms of lactic acid, whose value is in line with the Identity and Quality Standard of Fermented Milk (IQS). Also in accordance with the IQS of fermented milk, they must present a minimum count of 10^6 Colony-Forming Units per gram (CFU/g). Thus, the viability of lactic bacteria was studied in the fermented soymilk, either without gum or with increasing quantities of xantham and guar gums, during the 30-day storage period. After this period of analysis, all samples had counts in the order of 10^6 CFU/g, in compliance with the established standards for this category of products. Furthermore, no amount of gum was detected to influence the viability of the product, considering that the samples where gums were added showed similar behavior

relative to the control. Consequently, the conclusion was that it is possible to produce stabilized fermented soymilk using adequate concentrations of guar and xantham gum, and that this product complies with regulations on acidity and viability of the lactic culture required by the IQS of fermented milk.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO 1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 – A soja 3
2.1.1 – Histórico 3
2.1.2 – Composição e valor nutricional da soja 5
2.1.3 – Soja e saúde 6
2.1.4 – Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS) 7
2.1.5 – Extrato Hidrossolúvel Fermentado de Soja (EHFS) 8
2.2 – Alimentos Orgânicos 11
2.3 – Alimentos Funcionais 13
2.3.1 – As isoflavonas da soja 14
2.3.2 – Probiótico 15
2.3.3 – Prebiótico 16
2.3.4 – Simbiótico 17
2.4 – O Mercado de produtos naturais/funcionais 18
2.5 – Emulsões 19
2.5.1 – Mecanismos de instabilidade da emulsão 21
2.6 – Hidrocolóides 24
2.6.1 – Goma Xantana 25
2.6.2 – Goma Guar 27
2.6.3 – Carragena 27
2.6.4 – Alginatos 29
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS 30
CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS 31
4.1 – Materiais 31
4.1.1 – Ingredientes e Reagentes 32
4.1.2 – Equipamentos e Programas 33
4.2 - Métodos 34
4.2.1 – Estudo da Estabilidade do EHFS adicionado de gomas 34
4.2.2 – Caracterização da fermentação do EHS 38
4.2.3 - Avaliação da viabilidade das culturas láticas durante a vida de prateleira do produto40
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
5.1 – Estudo da Estabilidade do EHFS adicionado de gomas. 43
5.1.1 – 1ª Etapa: 43
5.1.1 – 2ª Etapa 50
5.2. – Caracterização da fermentação do EHS 59
5.3 – Avaliação da viabilidade das culturas láticas durante a vida de prateleira do produto. 62
5.4 – Teste na Indústria 64
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES 65
CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS 66
CAPÍTULO 8 – TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS 67
CAPÍTULO 9 – BIBLIOGRAFIA 68

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição centesimal Grão de Soja..... 5

Tabela 2: Composição Nutricional do Extrato de soja x Leite de Vaca (100 g)..... 8

Tabela 3: Produtos tipo "iogurte" de soja comercializados no Brasil e nos Estados Unidos 10

Tabela 4: Exemplos de produtos com probióticos comercializados no Brasil..... 16

Tabela 5: Composição do meio de cultura LACTOBACILLI MRS BROTH..... 33

Tabela 6: Concentrações de gomas (% p/p) para avaliação da faixa de estudo..... 35

Tabela 7: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2..... 36

Tabela 8: Ensaios contemplados no planejamento fatorial 2^2..... 36

Tabela 9: Amostras para ensaios de viabilidade de bactérias láticas..... 41

Tabela 10: Diâmetro médio ao cubo das micelas em função do tempo..... 44

Tabela 11: Equações de ajuste e coeficiente de determinação (R^2) para mecanismo de perda de estabilidade dos ensaios de EHFS acrescidos de goma guar e goma xantana, em 28 dias (D_M^3 = diâmetro médio ao cubo da micela (µc) e t = tempo (dias))..... 45

Tabela 12: Equações de ajuste e coeficiente de determinação (R^2) para mecanismo de perda de estabilidade das emulsões com combinações de goma guar e xantana em 25 dias (D_M^3 = diâmetro médio ao cubo da micela (µc) e t = tempo (dias))..... 53

Tabela 13: Planejamento experimental e respectivos resultados das 25 dias de estudo..... 57

Tabela 14: Concentração de rafinose, estaquiose e ácido lático (g/100g) no EHS e EHFS medidos em HPLC..... 61

Tabela 15: Contagem de células em EHFS, utilizando Agar MRS, durante tempo de armazenamento de 30 dias..... 63

Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição da Produção Mundial de Soja em 2009..... 4

Figura 2: Produção Mundial de Soja..... 4

Figura 3: Percepção do consumidor a respeito de Produtos Orgânicos..... 13

Figura 4: Crescimento de Bebidas Probióticas..... 19

Figura 5: Representação diagramática da estrutura de uma gotícula de óleo em uma emulsão do tipo óleo-em-água..... 20

Figura 6: Mecanismos de instabilidades de emulsões..... 22

Figura 7: Estrutura da goma xantana..... 26

Figura 8: Estrutura da goma guar..... 27

Figura 9: Estrutura das carragenas de importância comercial..... 28

Figura 10: Estrutura do ácido algínico..... 29

Figura 11: Fluxograma do processo de produção do Extrato Hidrossolúvel de Soja Fermentado..... 31

Figura 12: Ultra Turrax T25 basic da IKA®..... 34

Figura 13: Equipamento para captura de imagem..... 37

Figura 14: Processamento digital de imagens obtidas por microscopia..... 38

Figura 15: Amostras de EHS e EHFS liofilizadas..... 39

Figura 16: Equipamento para Cromatografia de Alta Eficiência..... 40

Figura 17: Jarra para cultivo de bactérias anaeróbicas em placas de petri..... 42

Figura 18: Observação visual direta das emulsões após 28 dias de adição dos hidrocolóides... 43

Figura 19: Gráfico de freqüência de distribuição das micelas na amostra controle..... 46

Figura 20: Gráficos de freqüência de distribuição das micelas nas amostras de EHFS acrescidas de goma guar nas concentrações de 0,20% (A), 0,35% (B) e 0,50% (C)..... 47

Figura 21: Gráficos de freqüência de distribuição das micelas nas amostras de EHFS acrescidas de goma xantana nas concentrações de 0,10% (A*), 0,20% (B*) e 0,30% (C*)..... 49

Figura 22: Observação visual direta após 25 dias de adição dos hidrocolóides..... 51

Figura 23: Diâmetro médio das micelas no primeiro e último dia de análise..... 52

Figura 24: Gaussianas de freqüência de distribuição das micelas nos ensaios 1 (A**), 2 (B**) e 9 (C**)..... 55

Figura 25: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento experimental. Variável dependente: variação do diâmetro médio (A***) e variação do diâmetro médio ao cubo (B***)..... 58

Figura 26: Cromatogramas de EHS (A****) e EHFS (B****) (1 - estaquiose; 2 - rafinose; 3 - glicose; 4 - sacarose e 5 - ácido lático). Fase móvel H2SO4 5mM, vazão 0,6mL/min, 60ºC, volume de injeção 20 µL, coluna Aminex HPX 87H e detector de IR (Waters)..... 60

Figura 27: Sobreposição dos picos de EHS (vermelho) e EHFS (preto) (1-estaquiose; 2-rafinose; 3-glicose; 4-sacarose e 5- ácido lático). Fase móvel H2SO4 5mM, vazão 0,6mL/min, 60ºC, volume de injeção 20 µL, coluna Aminex HPX 87H e detector de IR (Waters)..... 60

Figura 28: Placa para contagem de bactérias láticas em Agar MRS..... 62

Figura 29: Processo de envase de EHFS em planta industrial..... 64

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A soja e seus derivados têm sido utilizados há séculos nos países orientais como alimento básico da dieta daquelas populações e, mais recentemente, como ingredientes para produtos industrializados no ocidente. Dados epidemiológicos demonstraram que, além do câncer de mama e doenças cardiovasculares, a osteoporose, câncer de próstata e os sintomas da menopausa são raros nas sociedades asiáticas, demonstrando, assim, que a soja tem importante papel na saúde do indivíduo (CASÉ *et al*, 2005; ADETUNJI *et al*, 2006).

Pesquisas têm sido realizadas para identificar as potencialidades deste alimento, principalmente devido à quantidade e qualidade de sua proteína, sendo considerada, dentre os vegetais, o melhor substituto de produtos de origem animal. Além disso, a soja é importante fonte de outros compostos, como fibras, oligossacarídeos com potencial prebiótico, vitaminas e minerais (FUCHS *et al*, 2005).

A busca dos consumidores por dietas mais saudáveis também tem impulsionado o mercado de alimentos orgânicos. Segundo o Decreto nº. 6.323, de 27 de dezembro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007), sistema orgânico de produção é todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e sócio-econômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e de radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente.

Estudos recentes mostrando a relação entre dieta e saúde, somados ao crescente interesse de alguns indivíduos em consumir alimentos mais “saudáveis”, têm levado a indústria alimentícia ao desenvolvimento de novos produtos cujas funções pretendem ir além do fornecimento de nutrientes básicos e da satisfação do paladar do consumidor. Estes produtos são conhecidos como “alimentos funcionais”

re tem como principal função a redução do risco de doenças crônico-degenerativas (BEHRENS e SILVA, 2004).

Acompanhando estas tendências a empresa ECOBRAS – Centro Ecobiótico do Brasil Ltda., com consolidada experiência na elaboração e produção de alimentos orgânicos a base de soja, concluiu em 2007 o desenvolvimento de extrato hidrossolúvel fermentado de soja (EHFS) orgânico, em parceria com a FAPERJ e com a EMBRAPA AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

Este alimento é obtido da fermentação do extrato hidrossolúvel de soja com vários micro-organismos, especialmente bactérias ácido-láticas. Além de melhorar os atributos sensoriais, o processo de fermentação reduz ou mascara as propriedades de compostos indesejáveis, como, por exemplo, rafinose e estaquiose, que são reconhecidos como fatores que promovem desconforto gastrointestinal. (UMBELINO *et al*, 2001; FAVARO TRINDADE *et al*, 2001; TUITEMWONG *et al*, 2003; CRUZ *et al*, 2009).

O produto de consistência líquida e envasado em garrafas pequenas, típicas de iogurtes líquidos, foi lançado no mercado com o nome de *Yosoy* e a intenção da empresa em lançar o produto em versão cremosa, gerou novo desafio relativo à sua estabilização.

O extrato hidrossolúvel de soja submetido à fermentação para a obtenção do "iogurte de soja" é uma emulsão do tipo óleo em água, com a fase contínua constituída por uma dispersão de proteínas complexas. Este tipo de emulsão está presente em uma série de processos de instabilidade e a caracterização e o controle desses processos são aspectos-chave na formulação de produtos comerciais (SANTIAGO *et al*, 2002).

Freqüentemente adicionados a iogurtes para promover estabilidade e textura desejável, hidrocolóides como carragenas, goma guar, pectina e goma xantana, em condições específicas, possuem propriedades espessantes e estabilizantes que aumentam a firmeza e evitam o processo de sinérese (MUNHOZ *et al*, 2004; TONELI *et al*, 2005; TELES e FLÔRES, 2007).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um extrato de soja orgânico fermentado, estabilizado, utilizando hidrocolóides naturais autorizados para a produção orgânica, e assim avaliar a influência destes sobre a cultura fermentativa e caracterizar o processo de fermentação através do consumo dos oligossacarídeos da soja e formação de ácido lático.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – A Soja

2.1.1 – *Histórico*

A soja (*Glicine max (L.) Merril*) é originária do Extremo Oriente. Na China, seu cultivo começou por volta de 2800 a.C., e sua semente era considerada sagrada pelo povo chinês, como o arroz, o trigo, a cevada e o painço. Somente no século XX a soja se tornou conhecida no Ocidente. Na década de 20 do século passado, agricultores americanos iniciaram o cultivo da soja em larga escala; sendo esta soja utilizada principalmente como ração animal. Durante a Segunda Guerra Mundial, quando os óleos comestíveis e as fontes tradicionais de proteínas começaram a se tornar cada vez mais escassos, a soja, pela primeira vez, foi utilizada em larga escala em produtos destinados ao consumo humano (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

No Brasil, esta leguminosa chegou em 1908, mas a ampliação de seu cultivo ocorreu apenas nos anos 70 com o aumento do interesse na produção e demanda internacional de óleo (BOWLES e DEMIATE, 2006). Na década de 1970, o governo brasileiro investiu na expansão do cultivo da soja, com incentivos fiscais à pesquisa. Começaram então a serem desenvolvidas cultivares adaptadas para diversas regiões do país. Com a descoberta e utilização dos alelos para período juvenil longo e florescimento tardio, a soja pode ser cultivada a baixas latitudes, inclusive na área do equador (LAZARRI, 2006).

Como pode ser observado na Figura 1, os Estados Unidos são os maiores produtores de soja, seguidos pelo Brasil, Argentina e China, responsáveis por aproximadamente 90% da produção mundial.

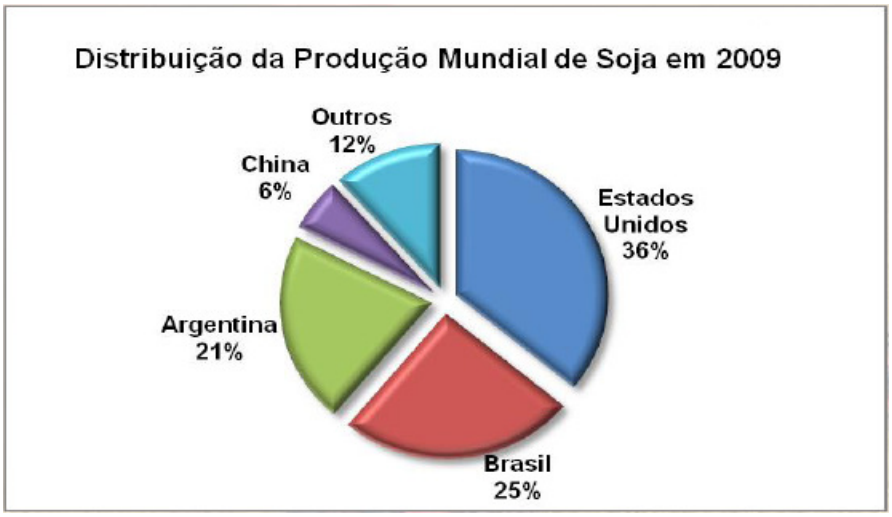


Figura 1: Distribuição da Produção Mundial de Soja em 2009
Fonte: IICA, 2009

Segundo levantamento do Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura (IICA, 2009), na safra 2008/2009, a produção mundial de soja foi de 242,18 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por 25 % deste total ou 69 milhões de toneladas (Figura 2). A produção de 2010 foi de 259,89 milhões de toneladas e a previsão para 2011 é de 253,69 milhões de toneladas.

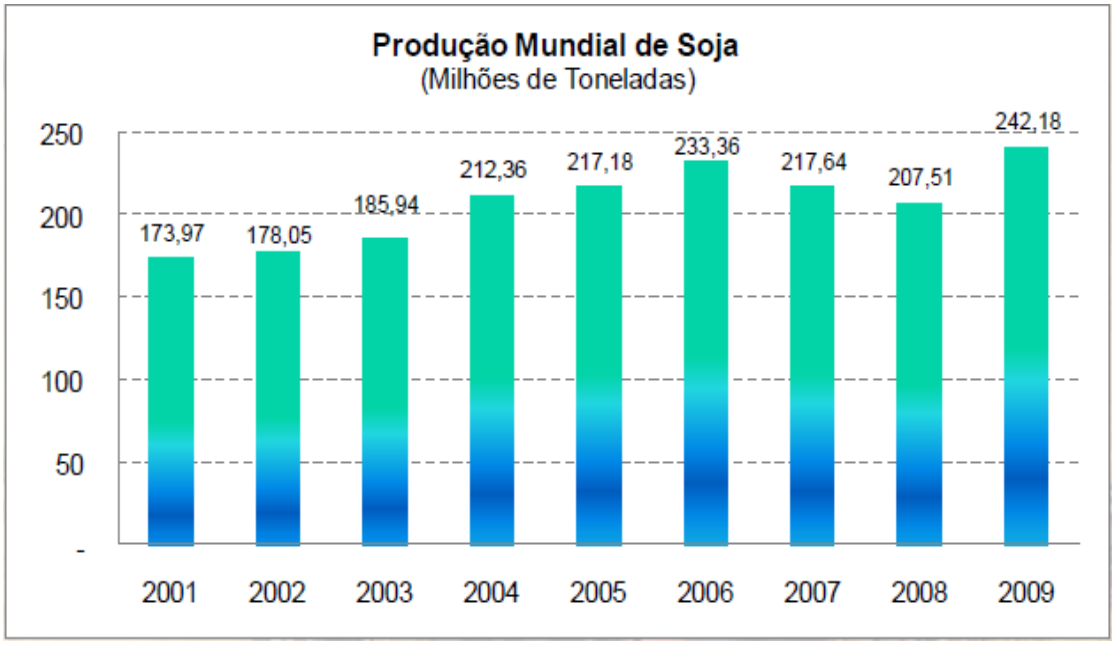


Figura 2: Produção Mundial de Soja
Fonte: IICA, 2009

Na atual busca por fontes renováveis e menos poluentes, a soja vem ganhando novas aplicações e usos não alimentares. São eles: utilização de óleo de

soja em lubrificantes industriais, tinta para impressão em gráfica, polímeros, compostos que substituem a madeira, usos na indústria de cosméticos como, por exemplo, na elaboração de protetores solares e cremes com ação antioxidante local, produção de biocombustíveis, dentre outros inúmeros usos (Embrapa, 2011).

2.1.2 – *Composição e valor nutricional da soja*

A soja tem recebido uma grande atenção da comunidade científica, principalmente devido ao seu perfil de nutrientes. Ela possui carboidratos complexos, proteínas, fibras solúveis e insolúveis, oligossacarídeos e fitoquímicos. É freqüentemente descrita como uma fonte rica em proteínas já que sua composição apresenta uma média de 30 a 45% de proteínas, 20 a 25% de carboidratos e 15 a 25% de lipídeos. Contém ainda minerais como o ferro, zinco, magnésio, potássio, cálcio, manganês e selênio, e vitaminas como o retinol, tiamina, riboflavina, piridoxina e ácido fólico (DALEPRANE *et al*, 2009).

O grão de soja é colhido, armazenado e comercializado com teor de umidade entre 8 e 11%. Sua composição centesimal está demonstrada na Tabela 1. O teor dos compostos é bastante variável, sofrendo influência de fatores tais como tipo de cultivar, época do plantio, localização geográfica e estresse ambiental (LAZZARI, 2006).

Tabela 1: Composição centesimal **Grão de Soja**.

	Valor por 100 g
Umidade	9,7 g
Energia	363 kcal = 1.517 kJ
Proteínas	40,5 g
Lipídios Totais	22,1 g
Carboidratos	22,1 g
Cinzas	5,6 g
Fibra Alimentar Total	21,7 g

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - USP. Versão 5.0, 2008.

Apesar dos baixos teores de aminoácidos sulfurados, a soja é importante fonte de lisina e seu significativo conteúdo de óleo faz com que seja uma boa fonte de energia (GOLDFUS *et al*, 2006).

2.1.3 – *Soja e saúde*

Dentre os alimentos cujas alegações de saúde têm sido amplamente divulgadas pela mídia nos últimos anos destaca-se a soja. Suas características químicas e nutricionais a qualificam como um alimento funcional: além da qualidade de sua proteína, estudos mostram que a soja pode atuar na redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (BEHERENS e SILVA 2004; ADETUNJI, 2006; CIABOTTI *et al*, 2006). São componentes tais como os antioxidantes naturais, isoflavonas e fosfolipídios que auxiliam no bem-estar físico, melhorando o funcionamento do organismo e prevenindo doenças crônico-degenerativas (MORAES *et al*, 2006).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que fraturas por osteoporose, doenças cardiovasculares, sintomas pós-menopausa e alguns tipos de câncer tem menor incidência em asiáticos quando comparados às suas contrapartes ocidentais. A fratura do quadril, por exemplo, é 50-60% menos freqüente entre mulheres asiáticas do que em ocidentais. Entretanto, esta vantagem é gradualmente anulada a medida que as asiáticas adotam os hábitos ocidentais. Estas observações levaram os pesquisadores a examinar os hábitos alimentares asiáticos, nos quais a soja é parte importante da dieta tradicional, mostrando ter alguma relação com as doenças acima referidas (ROUDSARI *et al*, 2005).

Nos Estados Unidos, em 1999, a *Food and Drug Administration (FDA)* divulgou um documento para conhecimento público, ressaltando as ações em potencial da soja na redução do risco de doenças cardíacas e autorizando as indústrias, daquele país, a informar nos rótulos de seus produtos as propriedades benéficas associadas ao consumo de soja. Anteriormente, esse mesmo órgão anunciou que a ingestão diária de 25 g de proteína de soja, como parte de uma dieta com baixa concentração de ácidos graxos saturados e colesterol, poderia reduzir o risco de doenças cardíacas.

2.1.4 – *Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS)*

O EHS é um extrato aquoso de grãos de soja, uma emulsão do tipo óleo em água com a fase contínua constituída por uma dispersão de proteínas complexas. O método convencional de processamento para a produção do EHS é o tratamento do produto por calor após maceração e moagem dos grãos de soja em água (CRUZ *et al*, 2009).

Apesar do grande potencial do extrato de soja, este obteve, no passado, baixa aceitação no Brasil, basicamente devido ao sabor e aroma desagradáveis ao paladar dos consumidores brasileiros. A ação de enzimas presentes nos grãos de soja sobre os ácidos graxos poliinsaturados confere ao produto final um sabor que lembra feijão cru. Entretanto, recentemente, a indústria nacional tem feito uso de novas tecnologias na obtenção do extrato de soja para o mercado brasileiro que apresenta 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 sua atitude em relação aos produtos a base de soja (BEHRENS e SILVA, 2004; DONKOR *et al*, 2007).

Para muitas pessoas o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) pode substituir o leite de vaca devido à intolerância ao leite bovino (Tabela 2). Segundo o Instituto Nacional de Doenças Digestivas, Renais e Diabetes (EUA), cerca de 75% da população mundial é intolerante à lactose (CASÉ *et al*, 2005).

Tabela 2: Composição Nutricional Extrato de soja x Leite de Vaca (100 g)

	Extrato de Soja	**Leite de Vaca**
Valor Energético	54 kcal = 226 kJ	61 kcal = 256 kJ
Carboidratos	6,3 g	4,8 g
Proteínas	3,3 g	3,2 g
Gorduras Totais	1,8 g	3,3 g
Gorduras Saturadas	0,2 g	1,9 g
Gorduras Monoinsaturadas	0,4 g	0,8 g
Gorduras Poliinsaturadas	1,0 g	0,2 g
Colesterol	0 mg	10 mg
Fibra Alimentar	0,6 g	0 g
Sódio	51 mg	43 mg
Cálcio	25 mg	113 mg
Ferro	0,64 mg	0,03 mg

Fonte: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2011.

2.1.5 – *Extrato Hidrossolúvel Fermentado de Soja (EHFS)*

A soja tem sido usada como uma significativa fonte protéica na dieta oriental devido ao seu alto rendimento produtivo, baixo custo e excelente valor nutritivo. Entretanto, apresenta sabor característico de grão ("beany flavor") resultante da oxidação ou decomposição de compostos orgânicos durante o processamento e, consumida em excesso, pode causar efeitos colaterais como desconforto gastrointestinal. Tem sido relatado que a fermentação da soja com bactérias láticas gera compostos sensorialmente agradáveis e melhora tanto o sabor quanto a textura dos produtos de soja (CHANG *et al*, 2010). Estudos mostram que é possível desenvolver um produto tipo iogurte a partir do EHS através de bactérias de fermentação ácido lática, incluindo *Streptococcus thermoplhilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (ADETUNJI, 2006).

Trabalhos reportam que algumas bactérias ácido láticas crescem lentamente ou quase não crescem no extrato de soja, além de produzirem baixos níveis de ácidos orgânicos. Para melhorar o crescimento de bactérias probióticas e a produção de ácidos orgânicos, o extrato de soja necessita ser suplementado com prebióticos diversos, tais como rafinose e inulina (DONKOR *et al*, 2007).

Assim como o leite de vaca, o extrato de soja é adequado para o crescimento de bactérias láticas e os oligossacarídeos (rafinose e estaquiose), aminoácidos e peptídeos presentes na soja estimulam o crescimento microbiano. Assim, o extrato de soja é considerado um bom veículo para bifidobactérias, já que sua proteína protege o micro-organismo da ação de sais biliares, favorecendo a colonização intestinal (HAULY *et al*, 2005).

O processo de fermentação pode melhorar os atributos sensoriais e ainda reduzir ou mascarar as propriedades dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose, que são reconhecidos como fatores de flatulência. A fermentação lática é responsável pela formação de acetaldeído e de diacetil, que conferem características sensoriais agradáveis, melhorando a aceitabilidade do extrato de soja utilizado para o preparo de bebidas tipo iogurte (CRUZ *et al*, 2009). Este processo é conduzido de forma semelhante para o extrato de soja fermentado e para o leite fermentado. A fermentação do açúcar faz com que ocorra a diminuição do pH, modificando a carga superficial das proteínas que se agregam para formar uma rede que aprisiona a fase líquida e gotículas de gordura. A procura de alternativas ao iogurte produzido com leite de vaca está crescendo devido a alguns problemas de alergenicidade às proteínas do leite, ao interesse por alimentos vegetarianos, à introdução de derivados de soja na dieta ocidental, entre outros (FERRAGUT *et al*, 2009).

Alguns produtos deste tipo são comercializados no Brasil, mas o hábito de consumo é mais comum no exterior, sendo a maior variedade encontrada nos Estados Unidos (Tabela 3).

Tabela 3: Produtos tipo “iogurte” de soja comercializados no Brasil e nos Estados Unidos.

PRODUTOS NO BRASIL	
	Ingredientes: Água, açúcar, pedaços de morango e framboesa, extrato de soja, amido modificado, fosfato tricálcico, fermentos, aromatizantes, corante natural antocianina e conservante sorbato de potássio. (Fermento: *S. thermophilus, L. bulgaricus*)
	Ingredientes: Água, soja orgânica, aroma natural de morango, corante natural carmim de cochonilha, espessantes goma xantana e carragena e culturas lácteas (*S. thermophilus, L. acidophilus* e *B. bifidum*).
PRODUTOS NOS ESTADOS UNIDOS	
	Ingredientes: Extrato de soja orgânico, açúcar orgânico, morangos orgânicos, aroma natural, pectina, carbonato de cálcio, suco de beterraba orgânico (para cor). Contém mistura de seis culturas vivas *S. thermophilus, L. bulgaricus, L. acidophilus, Bifidus, L. casei, e L. rhamnosus.* Contém soja e leite (culturas ativas a base de leite).
	Ingredientes: Extrato de soja orgânico, suco de cana orgânico evaporado, morangos, amido de milho orgânico, amido de arroz orgânico, aromas naturais, ácido lático (de fonte vegetal), repolho roxo (para cor), fosfato tricálcico, culturas ativas vivas (*L. acidophilus, B. bifidum, L. bulgaricus, S. thermophilus).*

	Ingredientes: Extrato de soja orgânico, suco de cana orgânico evaporado, água, morangos orgânicos, amido de arroz orgânico. Contém menos de 2% de: óleo de linhaça orgânico, fibra de chicória (inulina) orgânica, carbonato de cálcio, fosfato tricálcico, suco vegetal (para cor), dextrose orgânica, amido de mandioca orgânico, goma locuste orgânica, citrato de sódio, agar, aromas naturais, pectina, culturas ativas (*S. thermophilus, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. rhamnosus, B. bifidum, L. lactis*).
	Ingredientes: Extrato de soja orgânico, néctar de agave orgânico, extrato de raíz de chicória (inulina), dextrose de mandioca, óleo de soja orgânico, pectina, isolado protéico de soja, alginato (extrato de algas), amido de arroz orgânico, fosfato tricálcico, fosfato de magnésio, goma locuste, culturas vivas, carragena, fosfato dipotássio, vitamina B12. Culturas ativas incluem: *L. bulgaricus, S. thermophilus, L. plantarum, L. rhamnosus, L. paracasei, B. lactus.*
	Ingredientes: Extrato de soja orgânico, suco de cana orgânico evaporado, morangos, amido de arroz, dextrose, aromas naturais, fosfato tricálcico, sólidos de xarope de glicose, ácido cítrico, pectina, goma locuste, ácido ascórbico (vit C), suco de frutas e vegetais (para cor), culturas de iogurte (*L. bulgaricus, S. thermophilus, L. acidophilus, B. bifidum, L. casei, L. rhamnosus*).

2.2 – Alimentos Orgânicos

O sistema de produção denominado atualmente de convencional baseia-se na utilização intensiva de insumos químicos (agrotóxicos), mecanização pesada e melhoramento genético voltado para a produtividade física. No entanto, esse padrão de produção visando exclusivamente à produtividade, vem sendo muito questionado, em função da divulgação de aspectos negativos, tais como esgotamento dos recursos naturais, degradação ambiental, exclusão social, elevação dos custos de produção, contaminação dos alimentos por agrotóxicos e redução de sua qualidade.

Uma conseqüência da divulgação e da percepção desses aspectos indesejáveis tem sido a busca dos consumidores por dietas mais saudáveis e sem

riscos para a saúde, materializada no crescimento da produção de alimentos orgânicos, principalmente a partir da década de 90. Contudo, embora crescente, a área agriculturável destinada à produção de orgânicos é estimada em apenas 0,25% da área total brasileira cultivada (ARBOS *et al*, 2010).

Orgânico é um termo de rotulagem que indica que os produtos são produzidos atendendo às normas da produção orgânica e que estão certificados por uma estrutura ou autoridade de certificação devidamente constituída (BORGUINI e TORRES, 2006). Segundo a legislação brasileira, sistema orgânico de produção é todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e sócio-econômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e de radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2007).

Em uma pesquisa com consumidores, as principais razões para a compra de alimentos orgânicos foram: para evitar os pesticidas (70%), pelo frescor (68%), pelos benefícios nutricionais e de saúde (67%) e para evitar alimentos geneticamente modificados (55%) (WINTER e DAVIS, 2006). Um levantamento publicado pela empresa *Nielsen* (Nilsen, 2008) com consumidores na Irlanda, Grã-Bretanha e Holanda sobre a percepção a respeito de produtos orgânicos ratificaram as razões anteriormente citadas (Figura 3).

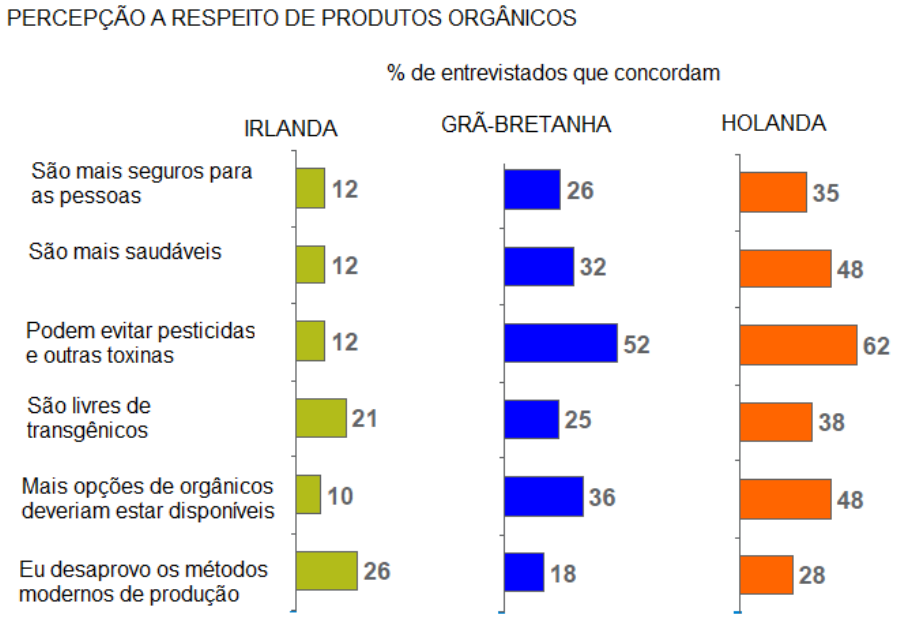


Figura 3: Percepção do consumidor a respeito de Produtos Orgânicos
Fonte: Nilsen, 2008

De acordo com a Instrução Normativa nº 16, de 11 de junho de 2004, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2004), para produtos com 95% ou mais de ingredientes orgânicos, será utilizado o termo ORGÂNICO e, para produtos com pelo menos 70% de ingredientes orgânicos, o termo PRODUTO COM INGREDIENTES ORGÂNICOS. Os ingredientes não orgânicos utilizados em produtos orgânicos precisam ser substâncias autorizadas para uso nesses produtos.

O anexo III da Instrução Normativa Conjunta nº 18, de 28 de maio de 2009, do MAPA e Ministério da Saúde (BRASIL, 2009), dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia permitidos no processamento de produtos de origem vegetal e animal orgânicos. Os hidrocolóides inclusos nesta lista são ágar, alginato de sódio, gelatina, goma arábica, goma acácia, goma guar, goma garrofina, goma caroba, goma alfarroba, carragena, goma jataí, goma xantana e pectina.

2.3 – Alimentos Funcionais

O conceito de que a natureza dá aos alimentos funções curativas e de promoção à saúde não é recente. Há 2.500 anos, Hipócrates proclamou: “Seja o alimento seu medicamento”. Na década de 80 os japoneses iniciaram estudos com alimentos funcionais, relacionando a ingestão de alimentos de sua população com os baixos índices epidemiológicos de câncer de mama, cólon e a alta longevidade.

Os benefícios potenciais dos alimentos funcionais para a saúde seriam a redução do risco de doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus* não dependente de insulina, osteoporose e câncer (PIMENTEL *et al*, 2005)

Segundo a portaria nº 398 de 30/04/99 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 1999), "alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica".

Observa-se um acelerado desenvolvimento de alimentos que apresentam, além de características nutricionais e tecnológicas adequadas, componentes que exercem funções biológicas com o intuito de reduzir o risco de doenças e promover a saúde: os alimentos funcionais. Dentre os alimentos funcionais estudados destacam-se a soja, os probióticos e os prebióticos (FUCHS et al, 2005). Probióticos, quando aplicados juntamente com prebióticos possibilitam uma nova forma de gestão da microflora conhecida como simbióticos, que podem conferir vantagens ainda maiores ao hospedeiro. Probióticos, prebióticos e simbióticos podem ser classificados como alimentos funcionais promotores de saúde e representam o maior segmento do mercado de alimentos funcionais da Europa, Japão e Austrália (SARKAR, 2008).

2.3.1 – *As isoflavonas da soja*

As isoflavonas são uma subclasse dos flavonóides e têm uma distribuição extremamente limitada na natureza. Embora poucas plantas sintetizem isoflavonas, a forma bioativa está contida em poucos vegetais de consumo humano, sendo a soja a maior fonte. Encontram-se, predominantemente, na forma de glicosídeos (ligados a moléculas de açúcar), embora os tipos de isoflavonas biologicamente ativas são as formas agliconas (sem a molécula de açúcar), dentre as quais estão a daidzeína, a genisteína e a gliciteína (ALLRED *et al*, 2004; PIMENTEL *et al*, 2005).

Estes compostos são conhecidos também como fitoestrógenos por se ligarem aos receptores de estrogênio, exercendo ação estrogênica ou antiestrogênica, dependendo do nível de hormônios sexuais endógenos. Isto é, podem exercer efeitos antagônicos ou não sobre os estrogênios endógenos, porque competem pelos mesmos receptores. Ademais, as isoflavonas da soja podem agir como inibidores de enzimas ligadas ao desenvolvimento do câncer como, por exemplo, na

tiroxina quinase, responsável pela indução tumoral; e como antioxidantes, inibindo a produção de oxigênio reativo, que está envolvido da formação de radicais livres (PIMENTEL *et al*, 2005).

Dentre os principais benefícios de saúde atribuídos às isoflavonas está a redução do risco do desenvolvimento de câncer, uma vez que afetam o crescimento de células cancerígenas dependentes de hormônios através de seus efeitos nos receptores de estrógeno e interferências com outros mecanismos e ciclos celulares; a redução dos sintomas da menopausa, tais como os fogachos e problemas de secura vaginal; a prevenção da osteoporose e a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, uma vez que a soja tem a capacidade de reduzir as concentrações totais de colesterol e de LDL-colesterol, e possui efeitos antioxidantes prevenindo a arteriosclerose (PIMENTEL *et al*, 2005).

2.3.2 – *Probiótico*

De acordo com a Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999, probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 1999).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios: não apresentar variação genética; ser estável; apresentar resistência ao ambiente ácido do estômago e a sais biliares, ter capacidade de aderir à mucosa intestinal e colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrintestinal humano, ter capacidade de produzir compostos antimicrobianos e metabólitos. É importante comparar a segurança para o consumo humano, o histórico de não patogenicidade, e a ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (PIMENTEL *et al*, 2005; HAULY *et al*, 2005).

Os probióticos podem atuar como inibidores de bactérias intestinais indesejáveis, como ativadores da imunidade humoral e celular e facilitadores da digestibilidade da lactose (PIMENTEL *et al*, 2005), sendo as espécies mais comumente usadas em preparações probióticas *Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. rhamnosus, L.reuterii, Enterococcus faecium, Bifidobacterium adolescentis, B.breve, B.bifidum,B.infantis, B.longum* (FUCHS *et al*, 2005).

As bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem um número mínimo no intestino (PIMENTEL *et al*, 2005). Para

receber a nomenclatura de “alimento probiótico”, os leites fermentados devem conter, no mínimo, 10^6 células viáveis por grama ou mililitro do produto (HAULY *et al*, 2005) e tais concentrações de micro-organismos probióticos viáveis devem ser mantidas constantes ao longo do armazenamento do produto (MARUYAMA *et al*, 2006).

Tradicionalmente, iogurte é produzido usando *Lactobacillus sp*. e *Streptococcus sp*. como *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Estas bactérias ácido-láticas promovem alguns benefícios à saúde, mas não são habitantes naturais do intestino nem sobrevivem no trato gastrointestinal. No entanto, *Bifidobacterium sp*., que é um micro-organismo importante no intestino humano, é considerada um probiótico para iogurte (CHANG *et al*, 2010) .

Diversos produtos contendo probióticos já podem ser encontrados no mercado brasileiro, sendo a grande maioria deles de base láctea (Tabela 4).

Tabela 4: Exemplos de produtos com probióticos comercializados no Brasil.

Produto	**Probiótico**
Leite Fermentado YAKULT (Yakult)	*Lactobacillus casei* Shirota
ACTIVIA (Danone)	*Bifidobacterium animalis*
ACTIMEL (Danone)	*Lactobacilus casei defensis*
Leite Fermentado CHAMYTO (Nestlé)	*Lactobacillus paracasei*
LECTIVE (Leco)	*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*
Leite Fermentado VIG TURMA (Vigor)	*Lactobacillus casei, L. acidophilus*

2.3.3 – *Prebiótico*

Pela legislação brasileira os prebióticos são definidos como todo ingrediente alimentar não digerível que afeta de maneira benéfica o organismo por estimular seletivamente o crescimento ou atividade de um número limitado de bactérias probióticas no intestino, beneficiando a saúde (BRASIL, 1999). Vários estudos têm chamado a atenção para o curto período de vida dos probióticos e para a contribuição dos prebióticos (oligofrutose, inulina, rafinose e estaquiose) no aumento da viabilidade destes no cólon (FUCHS *et al*, 2005; HAULY *et al*, 2005).

Dado que a microbiota colonizadora tem impacto sobre a saúde do hospedeiro, tem havido muito interesse ao longo dos anos em identificar formas de modular as atividades das bactérias do cólon e manipular a composição em favor da

saúde. Historicamente, isso tem sido buscado através do consumo de suplementos microbianos vivos, os probióticos, em uma tentativa de fortalecer o intestino. Entretanto, os probióticos são suplementos de bactérias vivas e precisam ser mantidos viáveis a fim de serem ativos. Para tanto, uma alternativa é o uso de prebióticos (RASTALL, 2009).

Segundo Pimentel (2005) para que um alimento seja classificado como prebiótico ele deve obedecer alguns critérios:

- Não deve sofrer hidrólise ou absorção no intestino delgado;
- Quando atingir o cólon deve ser metabolizado seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas;
- Deve ser capaz de transformar a microbiota do cólon em uma microbiota saudável;
- Ser capaz de induzir efeito fisiológico que seja importante a saúde.

O atributo chave dos prebióticos, que os diferencias das demais fibras dietéticas, é que eles são metabolizados seletivamente pelos membros da microbiota do cólon mais benéficos à saúde, influenciando assim o equilíbrio ecológico (RASTALL, 2009).

Os prebióticos abrangem as frutanas que incluem a inulina natural, inulina hidrolisada enzimaticamente ou oligofrutose e frutooligossacarídeos (FOS) sintéticos, além de galactoligossacarídeos, lactulose, isomaltoligossacarideo, xiloligossacarídeos, gentioligossacarídeos (HAULY *et al*, 2005).

A recomendação dietética para o efeito benéfico dos probióticos é de 18 a 20g/dia. No Japão estabeleceu-se como consumo diário aceitável cerca de 0,8g/kg de peso corpóreo por dia. A ingestão de prebióticos pode estar associada à flatulência. A gravidade desse tipo de sintoma está associada à dose de FOS consumida, sendo a ingestão de 20-30g por dia associada a um desconforto no indivíduo (PIMENTEL *et al*, 2005).

2.3.4 – *Simbiótico*

A combinação de alimentos que contêm bactérias vivas (probióticos) e determinados produtos que servem de substratos para essas bactérias (prebióticos) é conhecida como alimentos simbióticos, ou seja, alimentos que contêm tanto prebióticos como probióticos (PIMENTEL *et al*, 2005, KHURANA e KANAWJIA, 2007). São classificados como componentes dietéticos funcionais que podem

aumentar a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato digestório superior, pelo fato de seu substrato específico estar disponível para fermentação (HAULY *et al*, 2005; OLIVEIRA *et al*, 2008).

2.4 – O Mercado de Produtos Funcionais

O interesse e a busca do consumidor por alimentos mais saudáveis propiciam um rápido crescimento do segmento da indústria de alimentos que visa contribuir para o alcance de uma dieta de melhor qualidade (CASÉ *et al*, 2005).

Segundo relatório publicado em 2008 pela *Nilsen* (Nilsen, 2008), empresa especializada em pesquisa, informação e análise de mercado, apresentando o comportamento do mercado de alimentos e bebidas 2006-2007, questões relacionadas ao envelhecimento, obesidade e saúde infantil continuarão a impulsionar as compras das categorias mais importantes. As principais tendências e comportamentos de consumo relacionados à Indústria de Produtos de Consumo massificado estão relacionados à:

- Melhoria / manutenção da saúde;
- Busca por valor e praticidade;
- Um desejo por conforto e segurança.

Os consumidores de hoje preferem alimentos que promovem uma boa saúde e previnem doenças. Além disso, estes produtos devem ser adequados ao estilo de vida atual provendo conveniência no uso, bom sabor, e um bom custo-benefício (KHURANA e KAMAWJIA, 2007).

Entre 2006 e 2007, o crescimento global de categorias de Alimentos e Bebidas foi mensurado em 6%, sendo que bebidas probióticas apresentaram um crescimento de 13% (Figura 4). Este tipo de produto apresenta um ciclo menos sazonal quando comparado a outras categorias de bebidas (Nilsen, 2008).

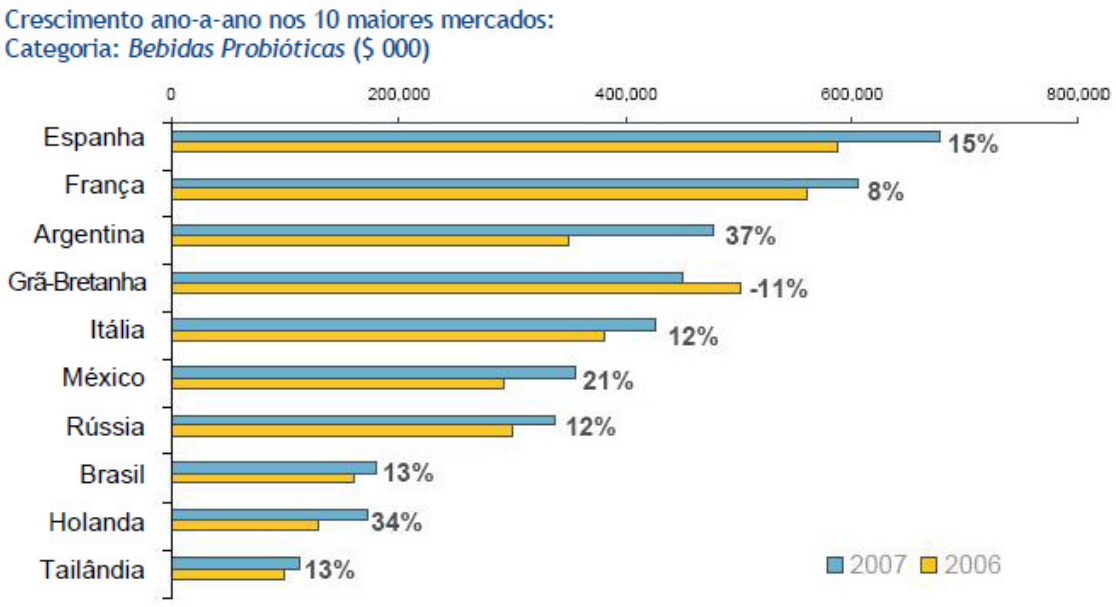


Figura 4: Crescimento de Bebidas Probióticas
Fonte: Nilsen, 2008

Também em publicação da *Nilsen* (Nilsen, 2004) sobre o crescimento de alimentos e bebidas em 2004, dentre as 89 categorias analisadas, a categoria de Bebidas a base de Soja foi a que apresentou a maior expansão (31%), seguida de iogurtes líquidos, com crescimento de 19%. Neste ano as tendências apontadas já eram:

- O enfoque contínuo na saúde;
- A necessidade de praticidade;
- O crescente impacto das marcas próprias.

2.5 – Emulsões

Emulsões são sistemas coloidais de dois líquidos imiscíveis, um disperso na fase contínua do outro. Certos alimentos são exemplos de emulsões do tipo "óleo-em-água", por exemplo, leite e maionese e do tipo "água-em-óleo", como a manteiga. Em muitos casos, a estrutura é complicada pela presença de partículas sólidas em suspensão ou de ar formando espuma (COULTATE, 2004; McCLEMENTS, 2009).

As emulsões são preparadas por agitação vigorosa ou homogeneização de dois líquidos imiscíveis a fim de formar gotículas da fase dispersa. Contudo, uma

emulsão simples decompõe-se rapidamente visto que as gotículas dispersas coalescem para formar uma camada que pode flutuar na superfície ou sedimentar no recipiente (COULTATE, 2004).

É possível formar emulsões cineticamente estáveis por um período de tempo razoável (alguns dias, semanas, meses ou anos), pela inclusão de substâncias conhecidas como estabilizantes. Um estabilizante é um ingrediente que pode ser utilizado para aumentar a estabilidade de uma emulsão e pode ser classificado tanto como um emulsificante quanto como um modificador de textura dependendo do seu mecanismo de ação (McCLEMENTS, 2009).

Emulsificantes são moléculas que pela redução da tensão superficial possibilitam que novas superfícies sejam produzidas mais facilmente quando a energia é incorporada ao sistema (p. ex., por homogeneizadores), permitindo, assim, que um maior número de gotículas seja formado. Agentes de atividade superficial possuem moléculas polares (ou "hidrofílicas") em uma extremidade e não-polares (ou "lipofílicas") na outra. Em emulsões, as moléculas dos emulsificantes orientam-se na superfície das gotículas, com a terminação polar na fase aquosa e a não-polar na fase oleosa (FELLOWS, 2006) (Figura 5).

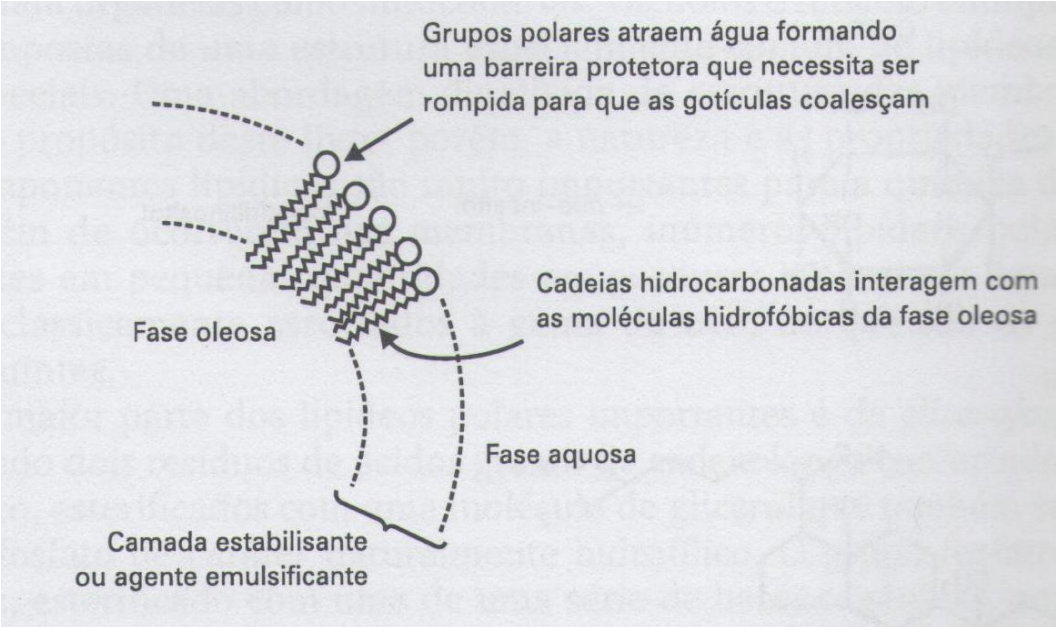


Figura 5: Representação diagramática da estrutura de uma gotícula de óleo em uma emulsão do tipo óleo-em-água.
Fonte: COULTATE, 2004

Modificadores de textura podem ser divididos em duas categorias: os espessantes e os gelificantes, dependendo da maneira como operam e das características reológicas de suas soluções. Agentes espessantes são ingredientes usados para aumentar a viscosidade da fase contínua das emulsões, enquanto agentes gelificantes são usados para formar um gel na fase contínua das emulsões. Portanto, modificadores de textura reforçam a estabilidade da emulsão por retardar o movimento das gotículas. Na indústria de alimentos, os mais utilizados habitualmente são proteínas ou polissacarídeos em emulsões "óleo-em-água" e cristais de gordura em emulsões "água-em-óleo" (McCLEMENTS, 2009).

Emulsões do tipo "óleo-em-água" têm atraído consideravelmente a atenção da indústria alimentícia devido às suas propriedades físico-químicas e atributos físicos. Entretanto, são sistemas termodinamicamente instáveis, especialmente aqueles com reduzido conteúdo de óleo, geralmente dividindo-se em duas fases distintas (LORENZO *et al*, 2008).

A fonte tradicional de agentes emulsificantes em preparações alimentícias é a gema de ovo devido a sua alta concentração de fosfolipídeos. A lecitina recuperada do óleo de soja durante a sua purificação preliminar vem apresentando valor crescente como um agente emulsificante natural alternativo, sobretudo para o uso em chocolates e outros artigos de confeitaria, e também quando se deseja um produto vegetariano. Para alimentos onde nem a gema de ovo nem a lecitina de soja são agentes emulsificantes apropriados, são utilizadas substâncias sintéticas como derivados do glicerol, ésteres de sorbitana e ésteres do ácido diacetiltartarato de monoglicerídeos (COULTATE, 2004).

Em produtos lácteos como o queijo, a sinerese é uma condição essencial na produção uma vez que está envolvida na eliminação de água das partículas do coágulo, o que é necessário para se alcançar a umidade apropriada para uma variedade de queijo. Em contraste, a separação do soro é um grande defeito quando ocorre na superfície de produtos tipo iogurte. A separação espontânea do soro ocorre quando o soro da superfície é expulso de um gel durante a gelificação e subseqüente envelhecimento (LUCEY, 2001).

2.5.1 – *Mecanismos de instabilidade da emulsão*

O termo "estabilidade da emulsão" é amplamente utilizado para descrever a habilidade de uma emulsão de resistir às mudanças em suas propriedades ao longo

do tempo. No entanto, há uma variedade de mecanismos físico-químicos que podem ser responsáveis por alterações nas propriedades da emulsão. Alguns mecanismos físicos são comumente responsáveis pela instabilidade de emulsões de alimentos (Figura 6) (SCHULZ, 2005).

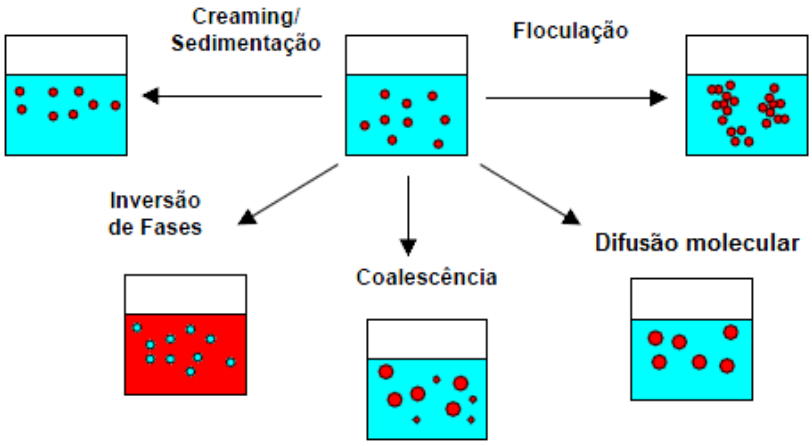


Figura 6: Mecanismos de instabilidade de emulsões
Fonte: SCHULZ, 2005

A formação de creme ("creaming") e a sedimentação são formas de separação gravitacional. A formação de creme descreve o movimento ascendente das gotas devido ao fato de que elas têm uma densidade mais baixa do que a do líquido circulante, enquanto a sedimentação descreve o movimento descendente das gotas devido ao fato de terem uma densidade maior do que a do líquido ao redor (McCLEMENTS, 2009).

O fenômeno de "creaming" recebe este nome pelo exemplo mais comum: pela separação da nata de leite. O que acontece neste caso, não é somente a quebra da emulsão, mas a separação em duas emulsões, uma rica na fase dispersa, a outra pobre. Conforme mostrado pela Equação de Stokes, Equação 1, alguns parâmetros podem inibir este fenômeno: a redução do tamanho da gota (r), a viscosidade da fase externa (η) e a diferença da densidade (d1 – d2). Claramente a redução do tamanho da gota é o maior efeito.

Equação 1

$$u = \frac{2gr^2 (d_1 - d_2)}{9\eta^2}$$

Onde, **u** é a taxa de sedimentação, **g** a aceleração da gravidade, **r** é o raio da gota, $\mathbf{d_1}$ é a densidade da esfera, $\mathbf{d_2}$ do líquido e $\boldsymbol{\eta_2}$ a viscosidade do líquido (SCHULZ, 2005).

Floculação e coalescência são dois tipos de agregação de gotículas. A floculação ocorre quando duas ou mais gotículas se juntam para formar um agregado no qual as gotas mantêm a sua integridade individual, enquanto que a coalescência é o processo pelo qual duas ou mais gotas se fundem para formar uma única gota maior (McCLEMENTS, 2009). A floculação pode ser evitada por simples agitação enquanto que a coalescência não (FREIRE, 2003).

A degradação da emulsão por coalescência é caracterizada por um alargamento na distribuição de tamanhos das partículas, com um aumento exponencial do volume da partícula (diâmetro médio ao cubo) em função do tempo, de acordo com a teoria de van den Tempel (Equação 2). Este processo se deve às moléculas individuais possuírem a tendência de deixar as micelas menores e difundirem-se através da fase contínua, até partículas de maiores dimensões.

$$R_M{}^3 = R_{M\,o}{}^3 \exp(Kt) \qquad \textbf{Equação 2}$$

Onde, $\mathbf{R_M}$ é o raio médio da partícula no tempo **t**, $\mathbf{R_M\ o}$ é o raio médio inicial da partícula e **K** é a constante da coalescência (SILVA, 2008).

A inversão de fase é o processo pelo qual uma emulsão “óleo-em-água” é convertida em “água-em-óleo” ou vice-versa (McCLEMENTS, 2009). Quando uma grande quantidade de emulsificante é introduzida na emulsão, com intensa agitação, a emulsão inicial pode ser invertida, ou seja, a fase dispersa se torna o meio de dispersão e vice-versa. Por exemplo, uma emulsão O/A estabilizada com oleato de sódio, pode ser convertida em A/O pela introdução de oleato de cálcio no sistema com agitação intensa (SCHULZ, 2005).

A difusão molecular ou processo de *Ostwald ripening* está relacionado com diferenças na pressão de vapor e solubilidade que existem entre diferentes micelas, ou seja, micelas menores possuem pressões de vapor e solubilidades superiores que micelas maiores. Isso é essencialmente um tratamento teórico conhecido como a teoria de Lifshitz-Slyozov-Wagner (LSW) e suas modificações, onde o mecanismo

molecular da difusão é caracterizado pelo crescimento linear do volume da micela com o tempo, aumentando com a solubilidade e a difusibilidade da fase dispersa (óleo) na fase contínua (água). Através de uma derivação longa e matemática abstrata, eles concluem que o raio médio das partículas $< R_M >$, cresce como segue (Equação 3):

$$d\,(R_M)^3/dt = 8CD\gamma\, V_m^2 / 9kT \qquad \textbf{Equação 3}$$

Onde, C e D são respectivamente a solubilidade e o coeficiente de difusão da fase dispersa no meio contínuo, o Vm é o volume molar do composto disperso, k é a constante de coalescência, e T a temperatura absoluta. (FREIRE *et al.*, 2005; GARCIA, 2008).

A estabilidade de uma emulsão pode ser estudada através da evolução do tamanho da gotícula e pela distribuição do tamanho da gotícula. O aumento do diâmetro médio é um indicador de perda da estabilidade da emulsão e a taxa de crescimento das gotículas revela o mecanismo responsável pelo seu envelhecimento. Dois mecanismos principais têm sido considerados responsáveis pela perda de estabilidade de emulsões: coalescência e difusão molecular (SILVA *et al*, 2010).

2.6 – Hidrocolóides

Os hidrocolóides, também chamados de gomas, são aditivos alimentares que têm função de espessar, estabilizar, encorpar, conferir viscosidade, elasticidade e dar a textura desejada ao alimento produzido. Podem, ainda, ser utilizadas como substituintes de gorduras, já que a gordura é fundamental para os efeitos sensoriais e fisiológicos dos alimentos, contribuindo para o sabor, percepção no aparelho bucal, aparência e aroma. Adicionalmente, contribuem como substituintes de açúcar e como fontes de fibras em dietas, sendo freqüentemente empregadas em produtos alimentícios *light* (MARUYAMA *et al.*, 2006).

Os hidrocolóides são, em sua maioria, de ocorrência natural, solúveis em água e têm propriedades espessantes e/ou gelificantes em condições específicas (MUNHOZ, 2004). A principal finalidade do uso de gomas em produtos lácteos cremosos é melhorar e manter as características reológicas, tais como textura, viscosidade, consistência, aspecto de corpo, tão importantes quanto as sensoriais como o sabor e aroma do produto (NIKAEDO *et al*, 2004).

A característica distintiva das gomas é a sua grande afinidade pela água e a elevada viscosidade de suas soluções aquosas. Contudo, elas não formam géis, e suas soluções sempre conservam a plasticidade mesmo em concentrações bem altas. A particularidade estrutural essencial em todas as gomas é a extensiva ramificação, capaz de aprisionar grandes quantidades de água e assegurar que, mesmo soluções bastante diluídas sejam viscosas.

Segundo Godoy e colaboradores (1998), o uso de hidrocolóides como estabilizantes se dá pelo espessamento da fase dispersante, formando uma rede tridimensional a qual engloba as partículas, mantendo-as em suspensão.

No passado, a aplicação habitual das gomas em produtos alimentícios era a de agentes espessantes substitutos para o amido. Hoje em dia, são usadas com freqüência em concentrações mais baixas como auxiliares na estabilização de emulsões e para "amaciar" a estrutura de produtos como sorvetes. Contudo, o entendimento recente de que são os compostos solúveis os responsáveis pelos efeitos benéficos de uma dieta rica em fibra na incidência de doenças arteriais chamou a atenção para o papel funcional das gomas (COULTATE, 2004).

2.6.1 – *Goma Xantana*

Tradicionalmente, os polissacarídeos usados no preparo e processamento de alimentos têm sido obtidos a partir de plantas terrestres e aquáticas como carragena, goma guar e carboximetil celulose. Outra fonte possível de polissacarídeos para uso em alimentos é dada pela capacidade bio-sintética de alguns micro-organismos não patogênicos com os quais se obtêm os biopolímeros bacterianos xantana, gelana e dextrana. O interesse por essa fonte de hidrocolóides reside nas características diferenciadas e vantajosas que eles apresentam, como: ingestão sem efeitos adversos, independência de produção com relação às condições climáticas e a instabilidade política de países produtores, permitindo continuidade em sua produção e alto rendimento a partir de substratos de baixo custo (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris.* É constituída de uma cadeia principal de unidades de D-glicose unidas entre si por ligações β(1-4) com resíduos alternados de D-manose e

ácido D-glicurônico, na proporção molar de 2:1, formando a cadeia lateral (MUNHOZ, 2004) (Figura 7).

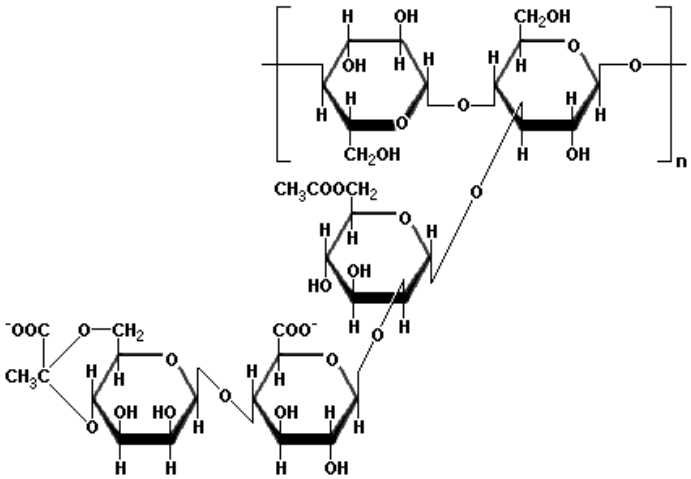


Figura 7: Estrutura da goma xantana
Fonte: The Merk Index, 1976.

Seu largo uso na indústria de alimentos é devido a: (1) solubilidade em água quente ou fria, (2) alta viscosidade a baixas concentrações, (3) pequena variação na viscosidade em função da temperatura, (4) excelente solubilidade e estabilidade em sistemas ácidos, (5) propriedades reológicas únicas que fornecem alta viscosidade sob pequeno cisalhamento e baixa viscosidade sob vigoroso cisalhamento, (6) excelente compatibilidade com uma larga gama de sais e (7) excelente estabilidade térmica (EL-SAYED *et al*, 2002).

Algumas das aplicações da goma xantana na indústria de alimentos são molhos, coberturas para saladas, catchup, produtos de confeitaria, produtos dietéticos, sucos de frutas, sopas e caldos, entre outros, e neles ela é utilizada como agente espessante, estabilizante, suspensivo e auxiliar de emulsificação, possibilitando a criação de novos produtos de diferentes texturas (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

O preparo de iogurtes e produtos tipo iogurte livre de defeitos de textura, consistência e sinerese continua a ser um problema na indústria lática e de similares. Gomas estabilizantes como a goma xantana são usadas para melhorar a textura, aumentar a firmeza e prevenir a sinerese no iogurte. Isto é importante para ajudar na manutenção de boa textura e propriedades visíveis durante o transporte e o armazenamento (EL-SAYED *et al*, 2002).

2.6.2 – *Goma Guar*

A goma guar é extraída do endosperma da semente de *Cyamopsis tetragonolobus*, uma planta pertencente à família das leguminosas. É um polissacarídeo solúvel em água, não forma gel e é compatível com outras gomas, amidos, hidrocolóides e agentes gelificantes (naturais e sintéticos). Interage sinergeticamente com a goma xantana resultando em aumento da viscosidade da solução (NIKAEDO *et al*, 2004).

Quimicamente é definida como uma galactomanana formada por cadeias lineares de unidades de D-manopiranosil ligadas entre si por ligações β(1-4) e unidades de D-galactopiranosil, ligadas entre si por ligações α(1-6) (MUNHOZ, 2004) (Figura 8). Esta goma produz soluções viscosas com comportamento pseudoplástico em baixas concentrações, isto é, a viscosidade decresce com o cisalhamento e é usada em aplicações nas quais é necessário espessamento, estabilização, controle reológico e de viscosidade, suspensão e formação de corpo, modificação de textura e consistência e retenção de água. Além disso, a goma não é desfavoravelmente afetada pelos baixos valores de pH e é efetiva em produtos ácidos (NIKAEDO *et al*, 2004; MARUYAMA *et al*, 2006).

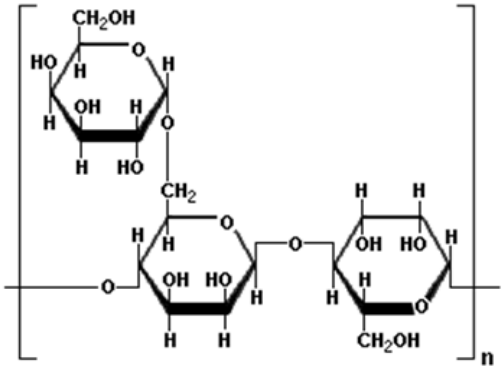


Figura 8: Estrutura da goma guar
Fonte: The Merk Index, 1976.

2.6.3 – *Carragena*

As carragenas são da família de polissacarídeos sulfatados lineares que podem ser extraídos como componentes da matriz de algas marinhas vermelhas. A sua estrutura química é baseada na repetição de uma unidade de dissacarídeos do tipo AB, de modo que elas podem ser escritas, de maneira geral como (AB)n, onde

A é derivado de unidades de ligações 1,3 de β-D-galactose e B , geralmente, mas não invariavelmente, está presente através de ligações 1,4 de 3,6-anidro-α-D-galactose (TONELI *et al*, 2005).

As carragenas são bem caracterizadas em termos de sua estrutura química e podem ser classificadas em μ, κ, ν, ι, λ, θ e ξ-carragenas. Dentre os vários tipos existentes, somente três são comercialmente importantes: κ, ι e λ,-carragenas (Figura 9). Elas são polímeros versáteis como aditivos em alimentos, sendo capazes de se ligar à água, promovendo a formação de géis e atuando como agente espessantes e estabilizantes. Vantagens adicionais estão na sua capacidade de melhorar a palatabilidade e a aparência. O uso das carragenas na indústria alimentícia inclui uma grande quantidade de sobremesas lácteas (sorvetes, achocolatados, flans, géis de leite) e conservas de carne, incluindo alimentos ou rações para animais. Além disso, a sua habilidade de permanecer em solução permite seu uso em molhos para salada (TONELI *et al*, 2005).

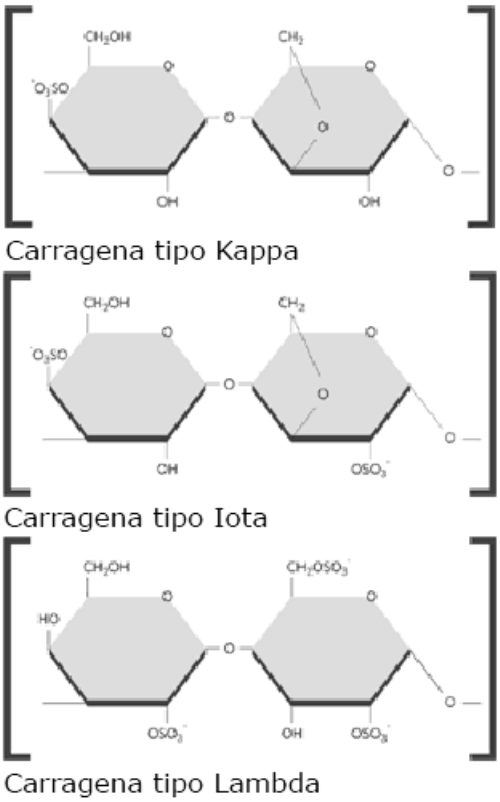


Figura 9: Estrutura das carragenas de importância comercial
Fonte: Food Ingredients, 2010.

2.6.4 – *Alginatos*

Alginatos são polissacarídeos estruturais que ocorrem, naturalmente, nas algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*) que crescem nas águas rasas das zonas temperadas e em bactérias do solo. Existem muitas espécies de algas marrons, mas, apenas, algumas são, suficientemente, abundantes e, convenientemente, localizadas para a produção de materiais de valor comercial, os alginatos. Assim como ocorre com as carragenas, alginatos é um termo coletivo para ácido algínico, seus sais e derivados (TONELI *et al*, 2005).

O ácido algínico é composto de duas unidades diferentes de monossacarídeos: ácido β-D-manurônico (M) e ácido α-L-gulurônico (G), unidos por ligações 1-4 (Figura 10). O próprio ácido algínico é insolúvel, porém seus sais de alcalimetálicos são espontaneamente solúveis em água. Formam géis rapidamente na presença de íons Ca^{2+}. Como se pode esperar, preparações de alginatos originados de diferentes espécies de algas variam suas proporções M/G, resultando em variações correspondentes de seus géis. Géis de alginato de cálcio não se fundem em temperaturas abaixo do ponto de fervura da água. Assim, encontram-se uma série de aplicações em produtos alimentícios. Se um purê de fruta é misturado com alginato de sódio e a seguir tratado com uma solução contendo cálcio, várias formas de fruta reconstituída podem ser obtidas (COULTATE, 2004).

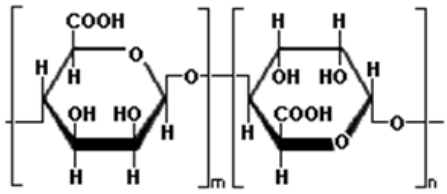


Figura 10: Estrutura do ácido algínico
Fonte: The Merk Index, 1976.

Segundo Toneli e colaboradores (2005), os alginatos não têm valor nutricional e são utilizados como aditivos para melhorar, modificar e estabilizar a textura de certos alimentos. Propriedades importantes incluem a melhora da viscosidade, habilidade de formação de gel e estabilização de misturas aquosas, dispersões e emulsões. Algumas dessas propriedades são provenientes das propriedades físicas inerentes dos alginatos, mas elas também podem ser resultado da interação com outros componentes do alimento, tais como proteínas, gorduras ou fibras.

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um extrato hidrossolúvel fermentado de soja orgânico estável, utilizando hidrocolóides naturais autorizados para a produção orgânica, avaliar a influência destes sobre a cultura fermentativa e caracterizar o processo de fermentação do EHS.

Para atingir este objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- ✓ Seleção dos hidrocolóides naturais para formulação do produto;
- ✓ Avaliação da estabilidade do extrato hidrossolúvel fermentado de soja com diferentes concentrações de gomas, durante o armazenamento, através de Análise Digital de Imagens;
- ✓ Caracterização do processo de fermentação do EHS pelo consumo de carboidratos da soja e produção de ácido lático;
- ✓ Avaliação da viabilidade da cultura lática no tempo de estudo e influência dos hidrocolóides naturais.

CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Materiais

O extrato hidrossolúvel fermentado de soja (EHFS), objeto deste estudo, foi fornecido pela empresa *Ecobras*, produtora de alimentos orgânicos a base de soja, localizada no município do Rio de Janeiro. O produto foi obtido de acordo com o processo descrito abaixo na Figura 11:

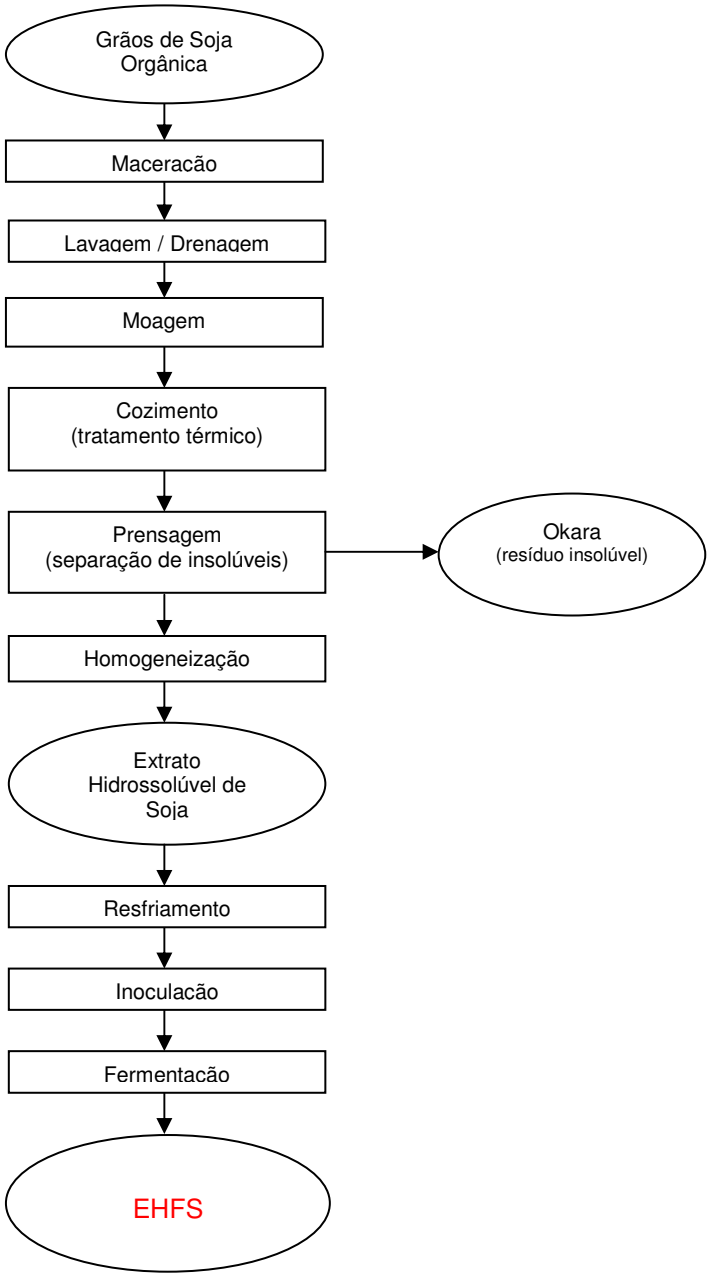


Figura 11: Diagrama do processo de produção do Extrato Hidrossolúvel de Soja Fermentado.

A fermentação foi realizada através da inoculação de cultura lática termofílica liofilizada composta por simbiose de várias cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* (Lyofast SAB 440 A), fornecida pela empresa SACCO BRASIL.

Segundo informações da *Ecobras*, o extrato hidrossolúvel de soja utilizado apresentou 6,5 ºBrix, o pH final de fermentação foi de 4,6 e o produto tem em sua composição 1,2% de carboidratos, 3,8% de proteínas e 1,8% de gorduras totais.

Para reproduzir características de produtos comerciais, o extrato de soja fermentado foi adoçado com 11% p/p de açúcar cristal orgânico claro da empresa NATIVE.

4.1.1 – *Ingredientes e Reagentes*

Foram usados na estabilização do EHFS goma xantana, goma guar, carragena e alginato de sódio, todos hidrocolóides de origem natural, permitidos para uso em alimentos orgânicos e de largo emprego na indústria alimentícia. As gomas xantana, guar e carragena foram fornecidas pela empresa Doce Aroma e o alginato de sódio pela FMC Bio Polymer.

No estudo de caracterização da fermentação foram utilizados padrões de rafinose, estaquiose, ácido lático, glicose e sacarose (Sigma chemical Co., St. Louis, Missouri).

Para avaliação da viabilidade das bactérias láticas no ESF foi utilizado meio para cultivo de bactérias do gênero lactobacilos, LACTOBACILLI MRS BROTH (Tabela 5), fornecido pela empresa Neogen, e gerador de anaerobiose (OXOID, ANAEROGEN). De acordo com informações do fabricante, este gerador de anaerobiose é ativado com o simples contato com o ar, produzindo em aproximadamente 30 minutos uma atmosfera de anaerobiose na qual as concentrações de gases serão de 10% de dióxido de carbono (CO_2) e menor que 1% de oxigênio (O_2); sendo seu princípio ativo, uma mistura de ácido ascórbico e carvão.

Tabela 5: Composição do meio de cultura LACTOBACILLI MRS BROTH

Componente	Quantidade por litro
Peptona	10 g
Extrato de carne	10 g
Extrato de levedura	5 g
Glicose	20 g
Acetato de Sódio	1 g
Fosfato Dissódico	2 g
Citrato Amoniacal	2 g
Sulfato de Magnésio	0.1 g
Sulfato de Manganês	0.05 g

Fonte: Rótulo do produto

4.1.2 – *Equipamentos e Programas*

Homogeneizador Ultra Turrax T25 basic da IKA® (9500rpm; 1min)

Microscópio Nikon Eclipse E200®

Camera digital Evolution VF fast cooled color MediaCybernetics QImaging®

Programa computacional Qcapture-Pro QImaging®

Programa computacional Matlab v.7.0.1®

Stat Soft, Inc. (2004) STATIATICA (data analysis softyware system), version 7.

Programa *Origin 7.1.*

Ultrafreezer CL120-80V Coldlab®

Liofilizador Enterprise®

Cromatógrafo Waters®

- Coluna Aminex® HPX- 87H, 300x7.8mm (Bio-Rad Laboratories Ltda.)
- Pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltda.)
- Detector de IR (Waters 2414)
- Bomba binária (Waters 1525)
- Forno e módulo controlador de temperatura (Waters)
- Software cromatográfico: HPLC Breeze

4.2 - Métodos

4.2.1 – *Estudo da Estabilidade do EHFS adicionado de gomas*

4.2.1.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O estudo de estabilidade do EHFS adicionado de gomas foi realizado em duas etapas, a primeira avaliando a ação individual de cada hidrocolóide e a segunda etapa observando a sinergia entre os hidrocolóides que apresentaram melhor desempenho na primeira etapa.

A adição das gomas foi realizada no Laboratório de Enzimologia da Escola de Química – UFRJ, sempre no dia seguinte à produção do EHFS pela *Ecobras*, de acordo com as concentrações determinadas para cada etapa do estudo. Neste processo foi utilizado um homogeneizador Ultra Turrax T25 basic da IKA® (Figura 12) e as amostras homogeneizadas a 9500 rpm por 1 minuto. Todas foram acondicionadas em tubos de centrífuga com tampa de rosca, colocadas em estante própria e mantidas a temperatura de refrigeração, de 8ºC a 10ºC. Esta temperatura foi escolhida por ser aquela freqüentemente praticada em estabelecimentos comerciais.

Figura 12: Ultra Turrax T25 basic da IKA®

4.2.1.2 - 1ª ETAPA

Consistiu na avaliação preliminar de estabilidade de cada goma individualmente para determinação da faixa de concentração a ser estudada. Para este estudo foram preparadas diferentes amostras contendo concentrações distintas de goma guar, carragena, goma xantana e alginato como resumido na Tabela 6.

O período de estudo foi de 30 dias, sendo este o tempo de viabilidade microbiológica estipulado pelo fornecedor do EHFS. A estabilidade das emulsões foram avaliadas nos tempos 1 dia, 15 dias e 30 dias, por análise de imagem digital (ADI).

Tabela 6: Concentrações de gomas (% p/p) para avaliação da faixa de estudo

Experimento	Goma Guar	Carragena	GomaXantana	Alginato
I	0,20%	-	-	-
II	0,35%	-	-	-
III	0,50%	-	-	-
IV	-	0,10%	-	-
V	-	0,30%	-	-
VI	-	0,50%	-	-
VII	-	-	0,10%	-
VIII	-	-	0,20%	-
IX	-	-	0,30%	-
X	-	-	-	0,10%
XI	-	-	-	0,50%
XII	-	-	-	1,00%

4.2.1.3 - 2ª ETAPA

Nesta etapa foi avaliada a sinergia das gomas guar e xantana na estabilização do EHFS, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2, incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabelas 7 e 8). As amostras foram analisadas por análise digital de imagem (ADI), em intervalos de 5 dias, durante o período de 25 dias.

Tabela 7: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2.

Variável	***-1,41***	***-1***	***0***	***1***	***1,41***
Goma Guar	0,18%	0,20%	0,25%	0,30%	0,32%
Goma Xantana	0,18%	0,20%	0,25%	0,30%	0,32%

Tabela 8: Ensaios contemplados no planejamento fatorial 2^2.

Ensaios	**Goma Guar**	**Goma Xantana**
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

4.2.1.4 - ANÁLISE DE ESTABILIDADE DE EMULSÕES POR ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS (ADI)

A estabilidade das emulsões foi avaliada através do estudo da evolução do tamanho das micelas durante o período de estudo, considerando que o aumento do tamanho das micelas sugere a perda da estabilidade do sistema.

Cada amostra foi diluída a uma proporção de 50µL de amostra para 400 µL de água destilada e em seguida dispostas duas gotas sobre lâmina, cobertas por lamínula e levadas ao microscópio ótico para visualização das micelas.

O tamanho das micelas foi determinado através da análise de imagens utilizando microscópio óptico *Nikon®*, modelo *Eclipse 200*, com ampliação de 40x, acoplado a uma câmara, *Evolution VF cooled color,* marca *MediaCybernetics®*, para fotografia digital (Figura 13). As imagens foram obtidas com o auxílio do programa *Qcapture 2.73.0* e posteriormente tratadas empregando o software desenvolvido em

MatLab® 6.1(1997), onde são efetuadas a contagem e a medição do tamanho das micelas, de acordo com o procedimento utilizado por MIGUEZ (2008).

Figura 13: Equipamento para captura de imagem

A análise de imagem realizada seguiu uma seqüência de três etapas: a binarização das imagens obtidas, a quantificação das micelas e o cálculo de parâmetros estatísticos (FREIRE *et al*, 2005).

A binarização consistiu na conversão da imagem capturada para uma imagem em preto e branco, com a eliminação de possíveis ruídos (Figura 14). Esta primeira etapa foi parte vital do processo de análise de imagem, uma vez que todos os dados mensuráveis foram obtidos a partir dela. A segunda etapa quantificou as micelas, apresentando o diâmetro, volume e área de cada micela. Na última etapa uma análise estatística dos dados obtidos a partir de várias imagens foi realizada para quantificar o número total de objetos analisados, o diâmetro médio das micelas e seu desvio padrão. Esta análise forneceu ainda a distribuição de tamanho da partícula e a sua circularidade, parâmetro este que permitiu detectar outros objetos que não as micelas (FREIRE *et al*, 2005).

Para calibrar o tamanho da micela, os pixels da imagem foram convertidos em micrômetros com o auxilio de um micrômetro e análise em um software, Image-Pro Plus® 5.0, o qual efetuou a referida conversão (SILVA, 2008).

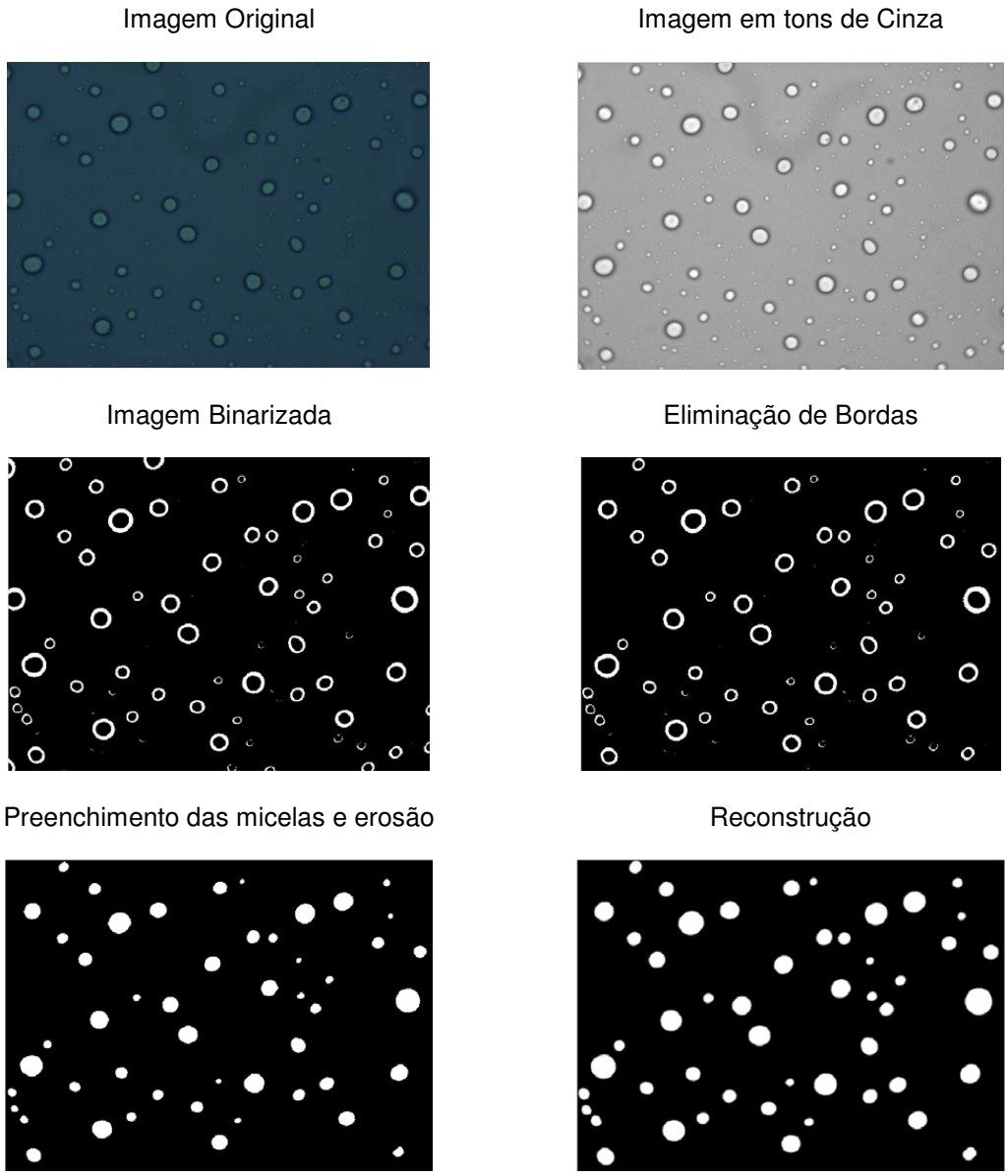


Figura 14: Processamento digital de imagens obtidas por microscopia.

4.2.2 – *Caracterização da fermentação do EHS*

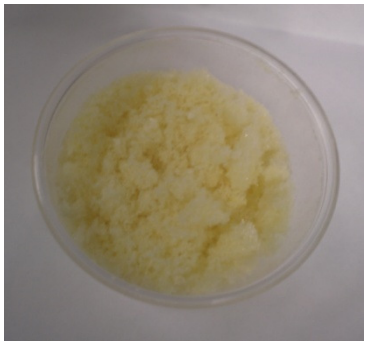
Para caracterizar o processo de fermentação do EHS pela cultura lática, foram avaliados o consumo de carboidratos da soja e a produção de ácido lático, pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.2.2.1 – EXTRAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

As amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS) e extrato fermentado de soja (EHFS) fornecidas pela Ecobras foram congeladas em ultrafreezer CL120-80V(Coldlab®) a – 50ºC e posteriormente liofilizadas (Liofilizador Enterprise®) (Figura 15).

Com base na metodologia proposta por KIM *et al.* (2003) para a extração de oligossacarídelos, um grama da amostra liofilizada foi diluído com água Milli-Q na proporção de 1/10 e mantido à temperatura de 50ºC por 4 horas. Após a extração, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, à rotação de 9000 rpm, e o sobrenadante filtrado em membrana com diâmetro de 0,45 µm para quantificação de rafinose, estaquiose, glicose, sacarose e ácido lático utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

EHS liofilizado



EHFS liofilizado

Figura 15: Amostras de EHS e EHFS liofilizadas

4.2.2.2 – DETECÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise de açúcares solúveis foi realizada por Cromatógrafo marca Waters®, fase móvel H_2SO_4 0.005 M, vazão 0,6mL/min, 60ºC, volume de injeção 20 µL, coluna Aminex® HPX- 87H, 300x7.8mm (Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltd), detector de IR (Waters 2414), bomba binária (Waters 1525), forno e módulo controlador de temperatura (Waters®), software cromatográfico: Breeze (Figura 16). Os padrões de rafinose, estaquiose, ácido lático, glicose e sacarose (Sigma chemical Co., St. Louis, Missouri) foram diluídos em água Milli-Q, injetados em triplicata e a concentração das

amostras calculada através da Equação 4, relacionando a área do padrão de concentração conhecida com a área desses compostos nas amostras (SONAGLIO *et al*, 1986; BOTTEON *et al*, 2008).

$$\left[amostra\frac{g}{L}\right] = \left(\frac{Aa}{Ap}\right) x \left[padrão\frac{g}{L}\right] x\, Fd \qquad \textbf{Equação 4}$$

Onde:

$\left[amostra\frac{g}{L}\right]$: concentração da substância estudada na amostra;

$\left(\frac{Aa}{Ap}\right)$: relação entre as áreas de picos, sendo Aa a área do pico de amostra e Ap a área do pico de padrão;

$\left[padrão\frac{g}{L}\right]$: concentração da solução padrão da substância estudada, com concentração conhecida;

Fd : Fator de diluição da amostra durante o processamento.

Figura 16: Equipamento para Cromatografia de Alta Eficiência

4.2.3 - *Avaliação da viabilidade das culturas láticas durante a vida de prateleira do produto*

Para a avaliação da viabilidade das culturas láticas durante a vida de prateleira e a possível interferência das gomas neste parâmetro foi utilizado o EHFS sem adição de goma como amostra controle, e três amostras intermediárias variando as concentrações de goma de 0,2% a 0,3%, como mostrado na tabela 9.

Tabela 9: Amostras para ensaios de viabilidade de bactérias láticas.

Amostras	Goma Guar	Goma Xantana
Controle	-	-
Amostra 1*	0,20%	0,20%
Amostra 2*	0,25%	0,25%
Amostra 3*	0,30%	0,30%

As amostras de EHFS controle, 1*, 2* e 3* foram analisadas após 1, 15 e 30 dias após a sua fermentação e permaneceram durante todo o tempo do estudo sob refrigeração de 8ºC a 10ºC, temperaturas comumente praticadas em estabelecimentos comerciais.

4.2.3.1- MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS

O método de contagem em placa é a técnica mais utilizada na determinação do tamanho de uma população bacteriana e quantifica apenas células viáveis. Este método considera que cada colônia é originada do crescimento e da multiplicação de uma bactéria. Entretanto, freqüentemente, uma colônia é resultado não de uma única bactéria, mas de uma cadeia ou um grumo de bactérias e por isso, as contagens em placa são comumente chamadas de unidades formadoras de colônias (UFC).

Pela convenção do *Food and Drug Administration*, o órgão norte-americano que controla alimentos e medicamentos, deve-se realizar a contagem somente em placas que contenham de 25 a 250 colônias, garantindo que não ocorra uma contagem errônea do número de células devido à saturação da placa. Para garantir que o número de colônias na placa permaneça na faixa desejada é empregado o método de diluição em série (TOTORA; FUNKE; CASÉ, 2005).

Para as análises deste trabalho foram realizadas diluições seriadas consistindo da homogeneização de 25 mL de cada amostra em 225mL de água peptonada a 0,1% (diluição 10^{-1}), e diluições sucessivas até a obtenção da diluição 10^{-7}. Pelo método de espalhamento em placa, 0,1 mL de cada diluição foi adicionado à superfície do meio contendo Agar MRS já solidificado e espalhado uniformemente através da utilização da alça de drigalski.

As placas foram incubadas em estufa bacteriologia a 36ºC em jarra de anaerobiose adaptada contendo gerador de anaerobiose (OXOID, ANAEROGEN)

por 48 horas (Figura 17). Após esse período, procedeu-se a quantificação das placas e os resultados foram expressos em UFC.mL^{-1}.

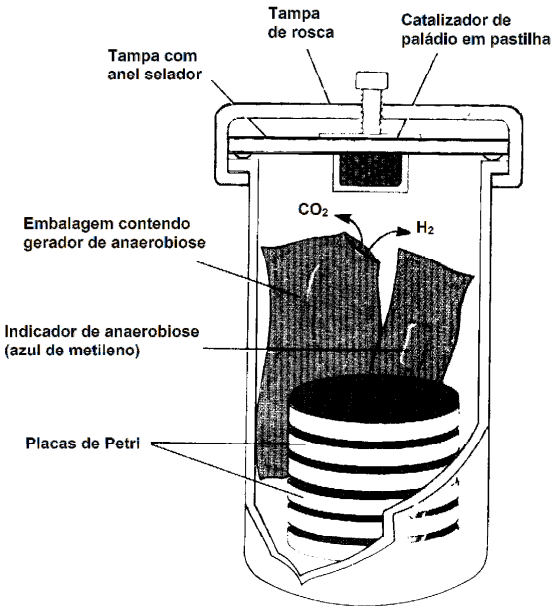


Figura 17: Jarra para cultivo de bactérias anaeróbicas em placas de petri.
Fonte: TOTORA; FUNKE; CASÉ, 2005.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação de estabilidade do EHFS adicionado de gomas, sua caracterização quanto ao consumo de carboidratos e formação de ácido lático durante o processo fermentativo e, a viabilidade das bactérias láticas durante o tempo de validade do produto são apresentados a seguir.

5.1 – Estudo da Estabilidade do EHFS adicionado de gomas.

5.1.1 – *1ª Etapa*:

Nesta primeira etapa, onde as gomas foram testadas individualmente, foi possível visualizar a separação de fases nas amostras acrescidas de alginato e carragena em todas as concentrações estudadas, sugerindo que estes hidrocolóides não são indicados para a estabilização do EHFS. As amostras adicionadas de goma guar e goma xantana, com excessão daquela com 0,1% de goma xantana, não apresentaram visualmente separação de fases durante todo o período de estudo (28 dias) (Figura 18).

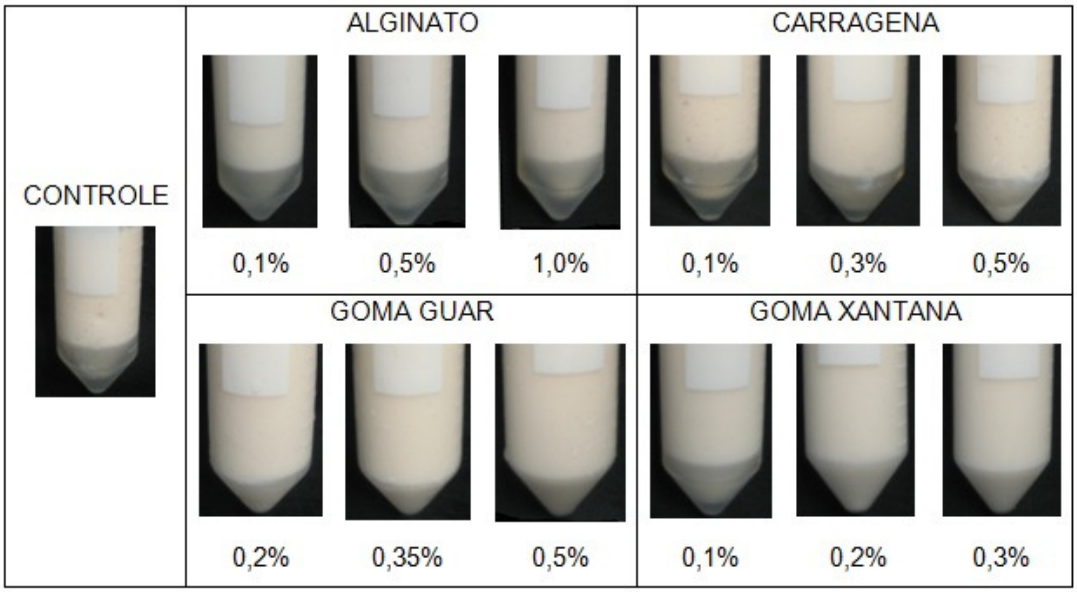


Figura 18: Observação visual direta das emulsões após 28 dias de adição dos hidrocolóides.

O ensaio controle e aqueles acrescidos de goma guar e goma xantana foram avaliados por análise digital de imagens. O ensaio adicionado de goma xantana na concentração de 0,1%, após 28 dias de estudo, apresentou variação do diâmetro

médio ao cubo das micelas (D_M^3) superior à observada para as demais concentrações, aproximadamente 38 vezes o volume inicial. Os demais ensaios: controle, goma guar 0,20%, goma guar 0,35%, goma guar 0,50%, goma xantana 0,20% e goma xantana 0,30%, aumentaram 1,7; 7,3; 1,5; 5,4; 3,5 e 8,8 vezes, respectivamente, o volume médio das micelas durante o tempo de armazenamento (Tabela 10).

Observa-se ainda que o tamanho inicial das micelas nas amostras acrescidas de goma é menor que o do controle. Tal fato pode ter ocorrido durante o processo de homogenização das gomas no EHFS devido à dispersão gerada pelo homegeizador *Ultra Turrax*.

Tabela 10 - Diâmetro médio ao cubo das micelas em função do tempo.

	Dia	**Controle**	**Goma Guar**			**Goma Xantana**		
			0,20%	**0,35%**	**0,50%**	**0,10%**	**0,20%**	**0,30%**
D_M^3 (µc)	1°	0,0058	0,0032	0,0019	0,0017	0,0012	0,0016	0,0010
	28°	0,0100	0,0233	0,0029	0,0093	**0,0455**	0,0056	0,0088

A perda de estabilidade das emulsões pode resultar de dois fenômenos principais: coalescência ou difusão molecular (processo de *Ostwald ripening*), sendo a degradação da emulsão por coalescência caracterizada por um aumento exponencial do volume da partícula com o tempo (teoria de van den Tempel) enquanto que no fenômeno de difusão molecular ocorre o crescimento linear do tamanho das micelas da emulsão (MIGUEZ, 2008). As equações 2 e 3 (ver 2.5.1) caracterizam os processos de coalescência e difusão molecular, respectivamente.

Na Tabela 11 é possível observar as equações de ajuste aos modelos linear e exponencial e os coeficientes de determinação (R^2) dos ensaios acrescidos de goma guar e de goma xantana. Os coeficientes de determinação são uma medida da proporção da variação total dos dados em torno da média e, portanto, quanto mais perto de 1 estiver o valor de R^2, melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas.

Confirmando o resultado visual da Figura 12, a amostra controle e a amostra de EHFS acrescida de 0,1% de goma xantana apresentaram valores de R^2 para o modelo linear iguais a 0,9815 e 0,9618, e valores de R^2 para o modelo exponencial iguais a 0,9963 e 0,9458, respectivamente, indicando que o processo de desestabilização destas emulsões se deu tanto por coalescência quanto por difusão molecular.

A amostra de EHFS contendo 0,20% de goma guar também apresentou valor alto de R^2 para os dois modelos (R^2 = 0,9510 para a equação linear e R^2 = 0,9981 para equação exponencial), sugerindo sua desestabilização também pelos dois processos, ainda que visualmente não tenha sido observada separação de fases.

Os demais ensaios apresentaram valor de R^2 muito pequenos indicando que as respostas observadas não se ajustam aos modelos indicativos de instabilidade e, portanto, permaneceram estáveis durante o período de estudo.

Tabela 11 – Equações de ajuste e coeficiente de determinação (R^2) para mecanismo de perda de estabilidade dos ensaios de EHFS acrescidos de goma guar e goma xantana, em 28 dias (D_M^3 = diâmetro médio ao cubo da micela (µc) e t = tempo (dias)).

Ensaio	Equação de ajuste	R^2
Controle	$D_M^3 = 0{,}0001t + 0{,}0056$	**0,9815**
	$D_M^3 = 0{,}0057\exp(0{,}0182t)$	**0,9963**
Goma Guar 0,20%	$D_M^3 = 0{,}0007t + 0{,}0019$	**0,9510**
	$D_M^3 = 0{,}0033\exp(0{,}0662t)$	**0,9981**
Goma Guar 0,35%	$D_M^3 = -2{,}0 \times 10^{-5}\, t + 0{,}0023$	0,1071
	$D_M^3 = 0{,}0023\exp(-0{,}0100t)$	0,1743
Goma Guar 0,50%	$D_M^3 = 4{,}0 \times 10^{-5} t + 0{,}0021$	0,4716
	$D_M^3 = 0{,}002\exp(0{,}0178t)$	0,5409
Goma Xantana 0,10%	$D_M^3 = 0{,}001t + 0{,}0172$	**0,9618**
	$D_M^3 = 0{,}0015\exp(0{,}1212t)$	**0,9458**
Goma Xantana 0,20%	$D_M^3 = 0{,}0001t + 0{,}0027$	0,5242
	$D_M^3 = 0{,}0021\exp(0{,}0418t)$	0,6279
Goma Xantana 0,30%	$D_M^3 = 0{,}0003t + 0{,}0047$	0,2703
	$D_M^3 = 0{,}0018\exp(0{,}0725t)$	0,5554

A freqüência de distribuição das micelas nos dias 0, 14 e 28 pode ser vista nos gráficos de distribuição normal das Figuras 19, 20 e 21, para as amostras avaliadas.

Observa-se que para o ensaio controle (Figura 19) a freqüência de distribuição dos diâmetros das micelas após 28 dias do preparo das emulsões apresenta pequena diferença em relação ao dia 0. Apesar disso, a observação visual e a adequação aos modelos linear (R^2 = 0,9815) e exponencial (R^2 = 0,9963) confirmam processo de desestabilização por coalescência e difusão molecular. Além destes mecanismos, uma vez que o ensaio controle não foi acrescido de gomas e, portanto, não está sujeito à barreira estérica causado por elas, pode ter ocorrido o processo de *creaming,* ou seja, ascensão das gotas devido à diferença de densidade.

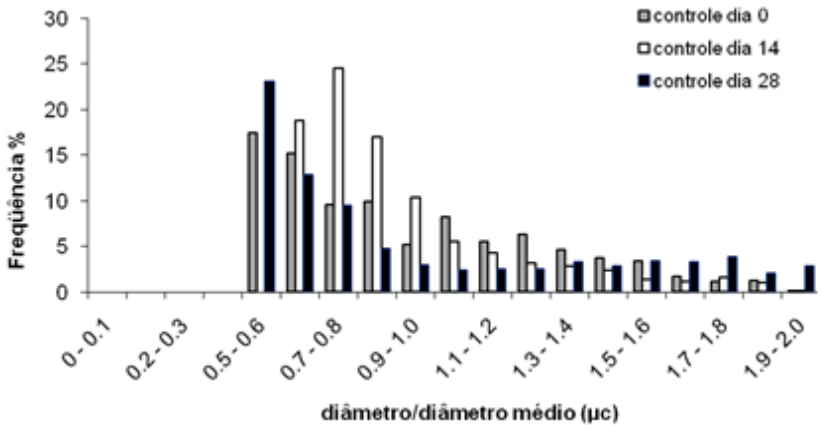


Figura 19: Gráfico de freqüência de distribuição das micelas na amostra controle.

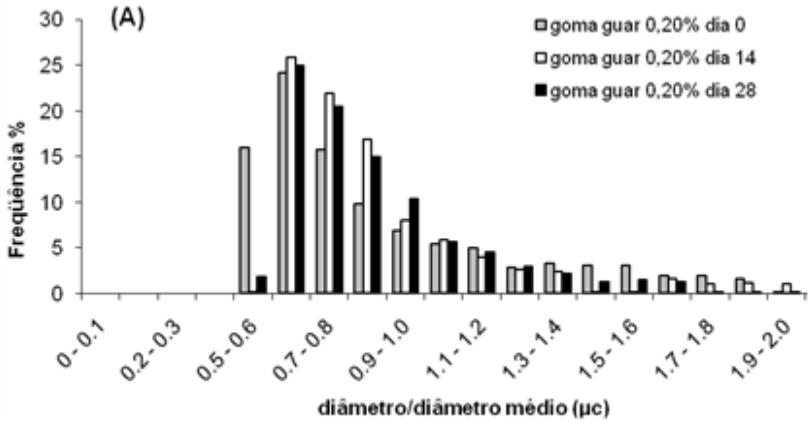
Ao final do tempo de estudo, o EHFS acrescido de 0,20% de goma guar (Figura 20-A) apresentou um deslocamento da freqüência do tamanho das micelas para valores maiores, o que ratifica seu ajuste aos modelos linear (R^2 = 0,9510) e exponencial (R^2 = 0,9981) e, conseqüentemente, a existência de processo de desestabilização por coalescência e difusão molecular, ainda que não observados visualmente.

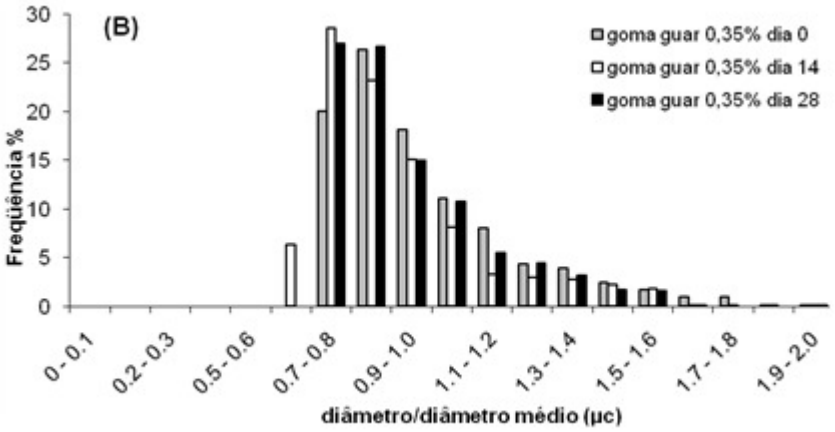
No ensaio contendo 0,35% de goma guar (Figura 20-B) foi observada uma homogeneidade na freqüência de distribuição das micelas durante todo o período de armazenamento, confirmando a não adequação aos modelos linear (R^2 = 0,1071) e

exponencial (R^2 = 0,1743) e a observação visual de que a amostra permaneceu estável.

A Figura 20-C, correspondente ao EHFS com 0,50% de goma guar, mostra um deslocamento da freqüência para diâmetros maiores de micela, indicando um possível processo de desestabilização. Entretanto, o ensaio não apresentou bom ajuste aos modelos linear (R^2 = 0,4716) e exponencial (R^2 = 0,5409), confirmando a observação visual de que a amostra se manteve estável durante o período pesquisado.

Todas as observações visuais estão apresentadas na Figura 18 (ver 5.1.1).





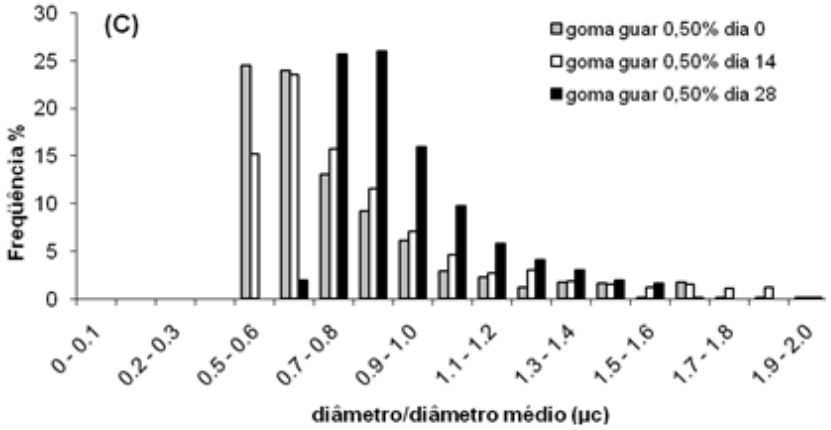


Figura 20: Gráficos de freqüência de distribuição das micelas nas amostras de EHFS acrescidas de goma guar nas concentrações de 0,20% (A), 0,35% (B) e 0,50% (C).

Na Figura 21, estão apresentados os gráficos de distribuição normal para as amostras de EHFS acrescidas de goma xantana.

O ensaio que teve adição de 0,10% de goma xantana (Figura 21-A*) apresentou distribuição heterogênea da freqüência das micelas durante o período de estudo de 28 dias, confirmando o processo de estabilização caracterizado pelo ajuste aos modelos linear (R^2 = 0,9618) e exponencial (R^2 = 0,9458) e pela observação visual de separação de fases.

A Figura 21-B*, referente ao EHFS com 0,20% de goma xantana, mostra um deslocamento dos valores máximos de freqüência de distribuição de tamanho de micelas. Entretanto não foi observada desestabilização visual e a avaliação do coeficiente de determinação também não indicou processo de desestabilização por coalescência (modelo exponencial, R^2 = 0,6279) ou difusão molecular (modelo linear, R^2 = 0,5242). Portanto, esta amostra permaneceu estável durante o tempo armazenamento.

Assim como no ensaio contendo 0,35% de goma guar (Figura 20-B), observou-se para a amostra de EHFS acrescida de 0,30% de goma xantana (Figura 21-C*) uma homogeneidade na freqüência de distribuição das micelas durante todo o período de armazenamento, confirmando a não adequação aos modelos linear (R^2 = 2703) e exponencial (R^2 = 0,5554) e a observação visual de que a amostra permaneceu estável.

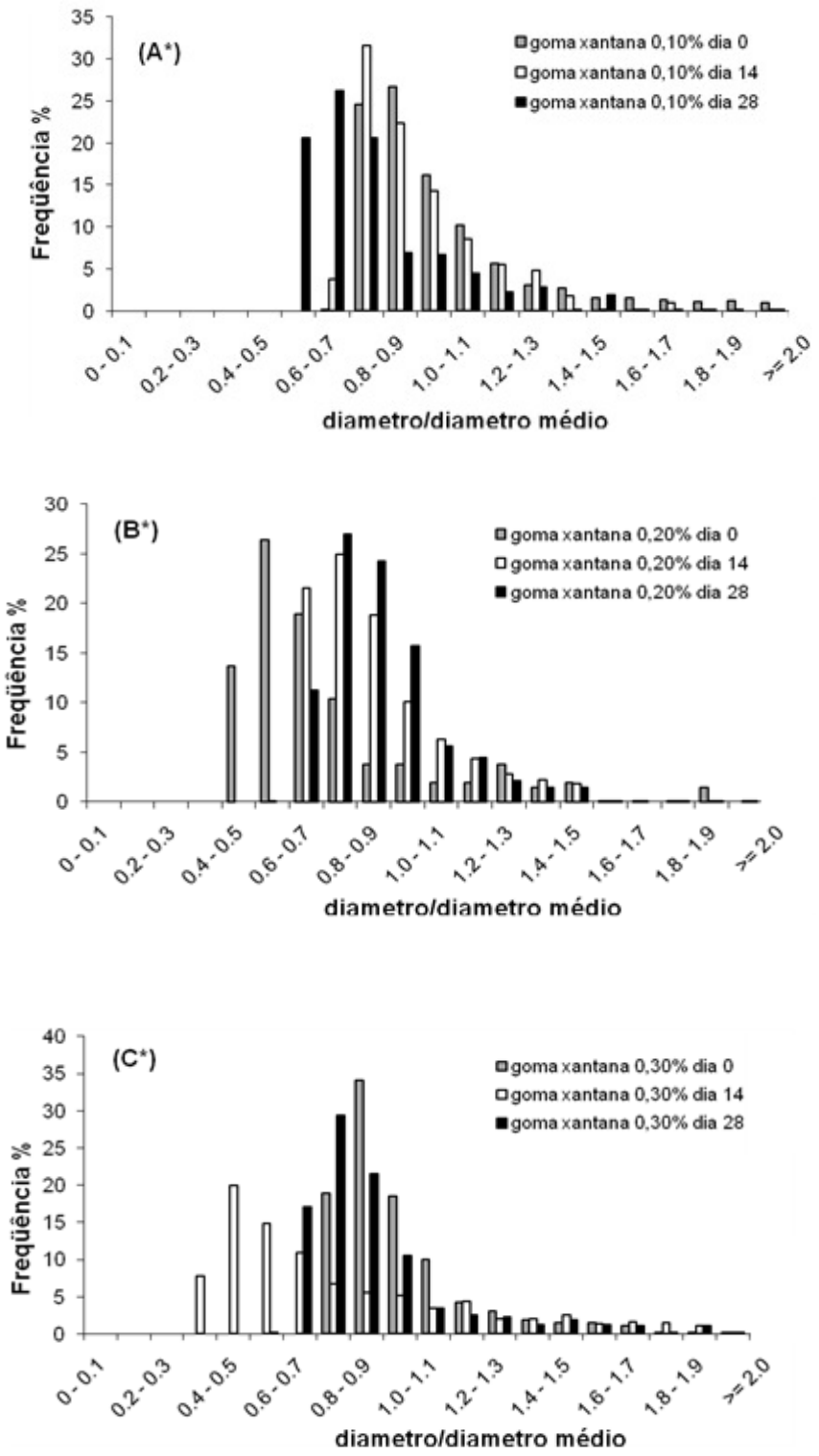


Figura 21: Gráficos de freqüência de distribuição das micelas nas amostras de EHFS acrescidas de goma xantana nas concentrações de 0,10% (A*), 0,20% (B*) e 0,30% (C*).

5.1.1 – *2ª Etapa*

Nesta etapa a combinação das gomas guar e xantana em diferentes concentrações foi avaliada de acordo com planejamento experimental apresentado na tabela 7 deste trabalho (ver 4.2.1.3). Pela observação das fotos obtidas de cada ensaio ao final de 25 dias de armazenamento (Figura 22, na seção 5.1.1), não foi possível visualizar a perda de estabilidade em nenhum dos ensaios acrescido das gomas. Apenas o controle apresentou separação de fases.

Foi realizada a análise digital de imagem de todos os 11 experimentos e do controle a fim de observar o comportamento das micelas ao longo do período estudado.

A Figura 23 apresenta os valores de diâmetro médio inicial e final, ou seja, valores de diâmetro médio apresentados no primeiro dia de análise e no último dia de análise, respectivamente.

Observa-se que as amostras que apresentaram maior variação com relação ao diâmetro médio foram as amostras controle (sem adição de gomas), 1 (0,20% guar + 0,2% xantana) e 10 (0,25% guar + 0,25% xantana). O aumento do diâmetro médio das micelas sugere um processo de perda de estabilidade.

Um possível problema na amostragem é observado no ensaio 10, o qual é um ponto central no experimento e, portanto, com a mesma concentração de gomas adicionada que os outros dois pontos centrais, os ensaios 9 e 11, nos quais não foi observada esta variação.

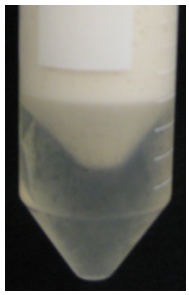
Controle  Sem adição	Ensaio 1 0,20% Goma Guar 0,20% Goma Xantana	Ensaio 2 0,30% Goma Guar 0,20% Goma Xantana
Ensaio 3 0,20% Goma Guar 0,30% Goma Xantana	Ensaio 4 0,30% Goma Guar 0,30% Goma Xantana	Ensaio 5 0,18% Goma Guar 0,25% Goma Xantana
Ensaio 6 0,32% Goma Guar 0,25% Goma Xantana	Ensaio 7 0,25% Goma Guar 0,18% Goma Xantana	Ensaio 8 0,25% Goma Guar 0,32% Goma Xantana
Ensaio 9 0,25% Goma Guar 0,25% Goma Xantana	Ensaio 10 0,25% Goma Guar 0,25% Goma Xantana	Ensaio 11 0,25% Goma Guar 0,25% Goma Xantana

Figura 22: Observação visual direta após 25 dias de adição dos hidrocolóides.

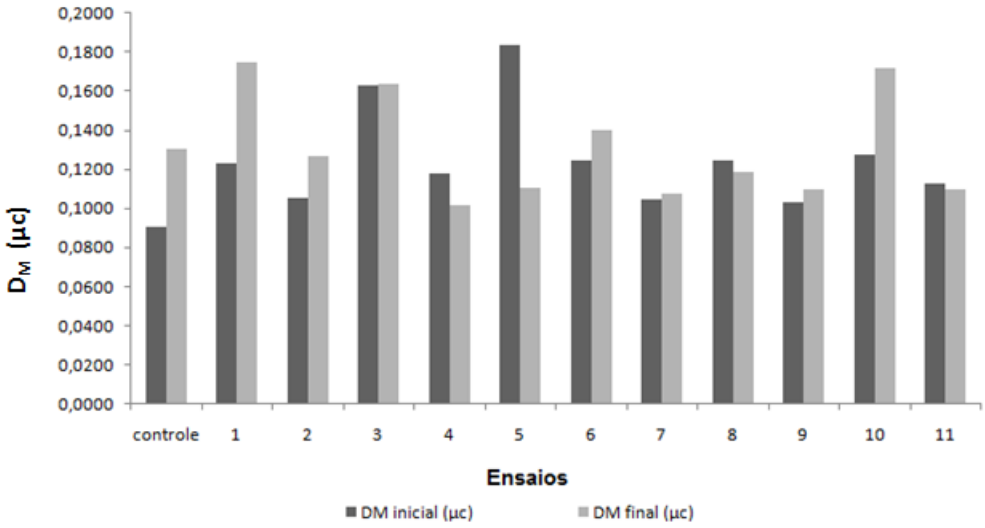


Figura 23: Diâmetro médio das micelas no primeiro e último dia de análise.

Conforme o número de ensaios determinados no planejamento experimental, a Tabela 12 resume as equações dos modelos de ajuste para a variação do diâmetro médio ao cubo das micelas (D_M^3) nas emulsões estudadas, ao longo do tempo de armazenamento, objetivando determinar se há perda de estabilidade e qual é o mecanismo predominante.

Tabela 12 – Equações de ajuste e coeficiente de determinação (R^2) para mecanismo de perda de estabilidade das emulsões com combinações de goma guar e xantana em 25 dias (D_M^3 = diâmetro médio ao cubo da micela (µc) e t = tempo (dias)).

Ensaio	**Equação de ajuste**	**R^2**
Controle	$D_M^3 = 0{,}0002t + 0{,}0007$	**0,9251**
	$D_M^3 = 0{,}0007 \exp(0{,}1435\ t)$	**0,9466**
1	$D_M^3 = 0{,}0001t + 0{,}001$	**0,8041**
	$D_M^3 = 0{,}0015 \exp(0{,}0458\ t)$	**0,8139**
2	$D_M^3 = 0{,}0012t - 0{,}004$	0,6973
	$D_M^3 = 0{,}0009 \exp(0{,}1509\ t)$	**0,8624**
3	$D_M^3 = 0{,}0001t + 0{,}0002$	0,4331
	$D_M^3 = 0{,}0009 \exp(0{,}0426\ t)$	0,3626
4	$D_M^3 = -1x10^{-5}t + 0{,}0018$	0,0778
	$D_M^3 = 0{,}0018 \exp(-0{,}011t)$	0,1372
5	$D_M^3 = 4x10^{-6}t + 0{,}0016$	0,0081
	$D_M^3 = 0{,}0016 \exp(0{,}003\ t)$	0,0131
6	$D_M^3 = 2x10^{-5}t + 0{,}0018$	0,0157
	$D_M^3 = 0{,}0016 \exp(0{,}0086\ t)$	0,0226
7	$D_M^3 = 2x10^{-5}t + 0{,}0012$	0,1845
	$D_M^3 = 0{,}0012 \exp(0{,}0114\ t)$	0,1963
8	$D_M^3 = 2x10^{-6}t + 0{,}0015$	0,0012
	$D_M^3 = 0{,}0015 \exp(0{,}0014\ t)$	0,0015
9	$D_M^3 = 1x10^{-5}t + 0{,}0017$	0,0074
	$D_M^3 = 0{,}0015 \exp(0{,}0084\ t)$	0,0211
10	$D_M^3 = -9x10^{-5}t + 0{,}0064$	0,0630
	$D_M^3 = 0{,}0048 \exp(-0{,}007t)$	0,0089
11	$D_M^3 = -8x10^{-6}t + 0{,}0017$	0,0787
	$D_M^3 = 0{,}0016 \exp(-0{,}005t)$	0,0789

Avaliando os ensaios em relação à perda de estabilidade de acordo com as equações de ajuste propostas pelas teorias de *Lifshitz-Slyozov-Wagner*, na qual o crescimento do volume da micela é linear, e *de van den Tempel*, na qual o crescimento do volume da micela é exponencial, observa-se que o ensaio controle (sem adição de gomas) e o ensaio 1 (0,20% de goma guar + 0,20% de goma

xantana) apresentaram bom ajuste para os dois modelos. Portanto, nestas duas amostras, o processo de instabilidade pode ocorrer tanto pelo mecanismo de coalescência quanto de difusão molecular. O ensaio 2 (0,30% de goma guar + 0,20% de goma xantana) teve valor de R^2 = 0,8624 para o modelo exponencial, sugerindo um processo de perda de estabilidade por coalescência. Os demais ensaios apresentaram baixo coeficiente de correlação (R^2) para ambos os modelos, linear e exponencial, corroborando com a avaliação visual de que os mesmos não tiveram perda de estabilidade.

Como pode ser observado na Figura 24, a qual ilustra as gaussianas de distribuição do tamanho das micelas no início e no final do experimento, no ensaio 1 (0,2 % de Guar + 0,2% de Xantana), Figura 24 (A**), embora o diâmetro médio tenha se mantido o mesmo, as micelas passaram a ter uma distribuição menos uniforme, como pode ser observado pelo "alargamento do pico". Esta heteriogenidade está associada a perda da estabilidade. Já no ensaio 2 (0,3% de Guar + 0,2% de Xantana), Figura 24 (B**), houve um aumento da frequencia do tamanho das micelas para diametros maiores, o que indica um processo de perda de estabilidade da emulsão nesta concentração. Os ensaios que permaneceram estáveis durante todo o período de estudo estão exemplificados pelo ensaio 9 (0,25% guar + 0,25% xantana), Figura 24 (C**), onde é possível observar que a distribuição do tamanho das micelas se manteve inalterada.

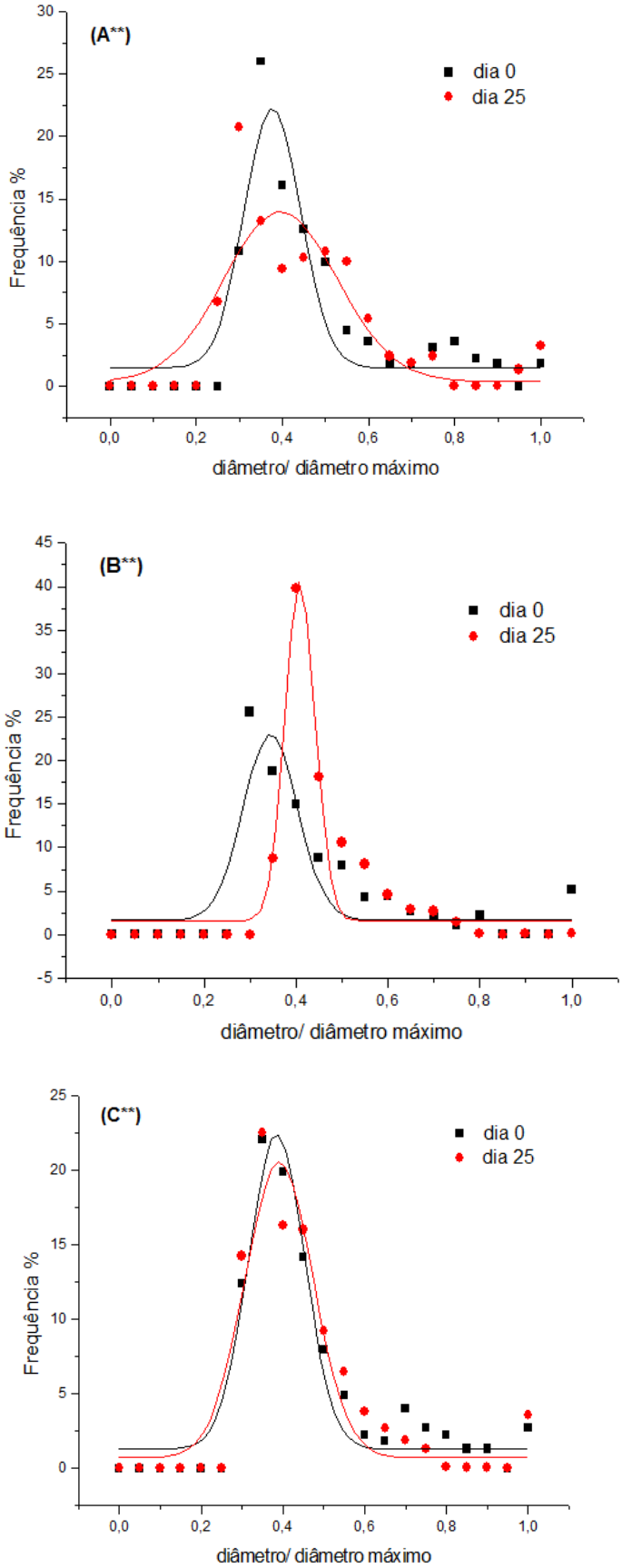


Figura 24: Gaussianas de freqüência de distribuição das micelas nos ensaios 1(A**), 2(B**) e 9(C**).

Vale destacar que apesar de os ensaios 1 e 2 terem apresentado aumento no diâmetro médio das micelas e ajuste aos modelos indicativos de desestabilização por coalescência e difusão molecular, não foi possível observar visualmente a separação de fases (Figura 22, na seção 5.1.1).

Em um estudo sobre o efeito da concentração de goma de sementes de algaroba e proteínas de soja na microestrutura de coágulos obtidos de leite, Hernández e colaboradores (2003), concluíram que tanto a goma quanto a proteína de soja produzem um impedimento de tipo estérico que não permite a correta adesão das caseínas para formar o coágulo.

Este impedimento estérico e a alta viscosidade causada pelas gomas podem explicar o fato de que mesmo havendo o aumento do tamanho das micelas e a existência de um processo de instabilidade, este não consegue ser observado visualmente devido ao impedimento estérico da rede polimérica formada pelas gomas quando estas estão em altas concentrações, como é o caso dos ensaios 1 (0,40% de gomas totais) e 2 (0,50% de gomas totais).

Para avaliação da influência das gomas nas variações do tamanho e volume das micelas, os resultados obtidos na realização do planejamento fatorial completo 2^2 são apresentados na Tabela 13, junto com as condições para cada um dos experimentos. As análises digitais das emulsões foram realizadas a cada 5 dias, durante 25 dias de estudo, e as variações do diâmetro médio ($\Delta D_M = D_M$ final - D_M inicial) e do diâmetro médio ao cubo ($\Delta D_M^3 = D_M^3$ final - D_M^3 inicial) foram utilizadas como variáveis resposta do experimento.

Tabela 13 – Planejamento experimental e respectivos resultados das 25 dias de estudo

Ensaios	Goma Guar	Goma Xantana	ΔD_M [a]	ΔD_M^3 [b]
1	0,20%	0,20%	**0,0515**	**0,00340**
2	0,30%	0,20%	**0,0218**	0,00080
3	0,20%	0.30%	0,0008	0,00010
4	0,30%	0.30%	- 0,0158	-0,00050
5	0,18%	0,25%	- 0,0730	-0,00480
6	0,32%	0,25%	0,0162	0,00090
7	0,25%	0,18%	0,0033	0,00020
8	0,25%	0,32%	-0,0053	-0,00020
9	0,25%	0,25%	0,0067	0,00020
10	0,25%	0,25%	-0,0486	-0,00570
11	0,25%	0,25%	- 0,0025	-0,00010

[a] Variação do diâmetro (µc) e [b] Variação do diâmetro médio ao cubo (µc).

Os diagramas de Pareto (Figura 25) apresentam a magnitude do efeito quantitativo estimado que cada variável dependente exerce sobre as variáveis resposta: variação do diâmetro médio (ΔD_M) e variação do diâmetro médio ao cubo (ΔD_M^3) das micelas das emulsões estudadas.

Para esta análise foi estabelecido um grau de confiança de 95% ($p < 0,05$) e pode-se observar que nenhuma das variáveis dependentes utilizadas no planejamento foi estatisticamente significativa frente às variáveis de resposta "variação do diâmetro médio" e "variação do diâmetro médio ao cubo".

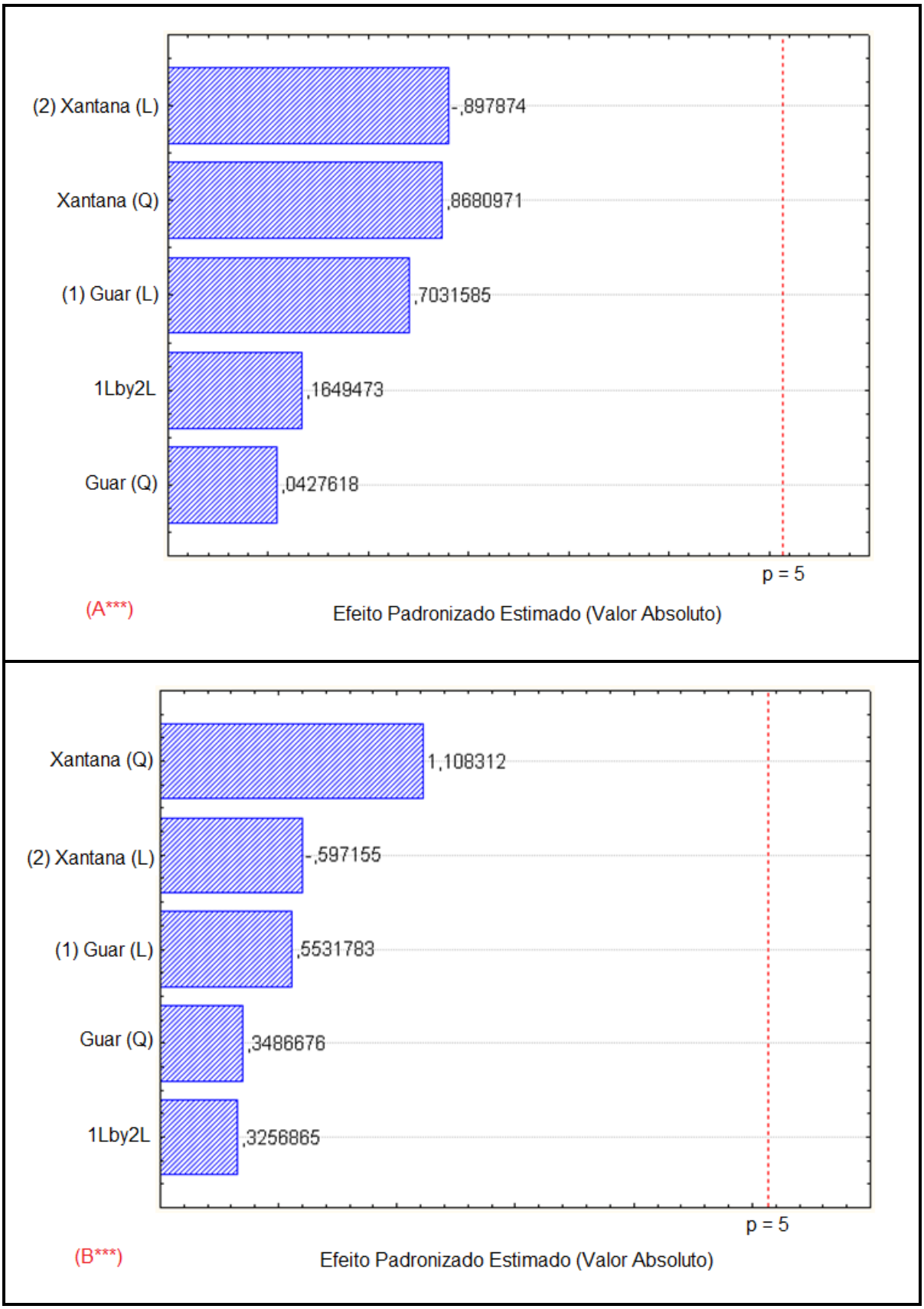


Figura 25: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento experimental. Variável dependente: variação do diâmetro médio (A***) e variação do diâmetro médio ao cubo (B**).

5.2. – Caracterização da fermentação do EHS

O processo de fermentação para fabricação de iogurte caracteriza-se pela conversão de parte da lactose em ácido lático, por ação da cultura microbiana, promovendo a desestabilização do complexo caseína-proteínas do soro, por solubilização do fosfato de cálcio e dos íons citratos. Os agregados de micelas de caseína e/ou micelas isoladas vão se associando e coalescem parcialmente à medida que o pH se aproxima de 4,6 - 4,7, ou seja, do ponto isoelétrico da caseína, formando o coágulo característico do iogurte (MORETTI, 2009)

De forma semelhante, a caracterização da fermentação do EHS foi avaliada através do consumo dos açúcares da soja e produção de ácido lático pelos micro-organismos da cultura fermentativa. A quantificação dos carboidratos (sacarose, glicose, rafinose e estaquiose) e ácido lático no EHS e no EHFS, foi obtida por análise cromatográfica (CLAE).

A Figura 26 apresenta os cromatogramas do EHS (A****) e do EHFS (B****), enquanto a Figura 27 mostra a sobreposição destes dois cromatogramas permitindo vizualizar as substâncias que foram metabolizadas e produzidas.

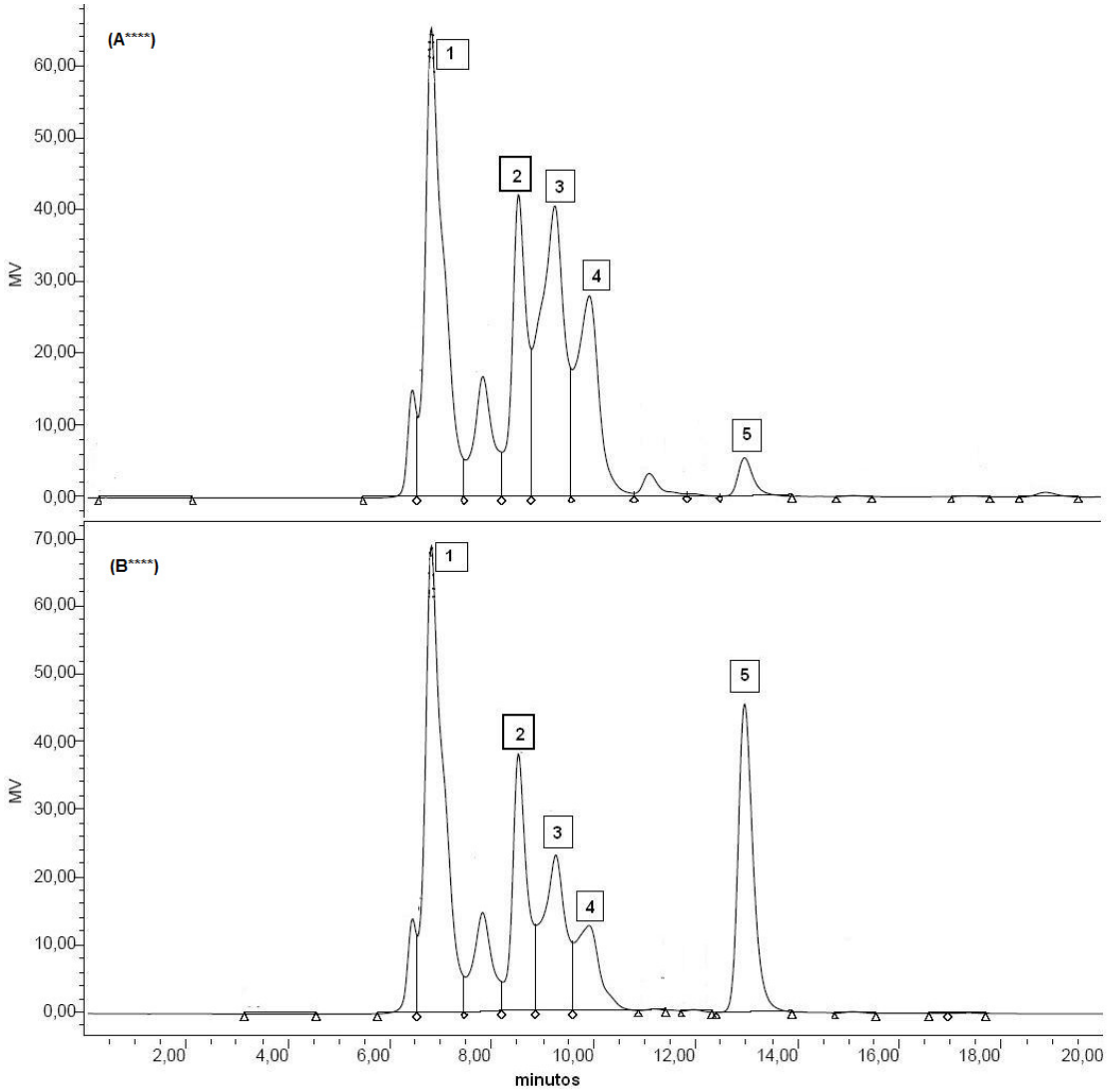


Figura 26: Cromatogramas de EHS (A****) e EHFS (B****) (1 - estaquiose; 2 - rafinose; 3 -glicose; 4 - sacarose e 5 - ácido lático). Fase móvel H2SO4 5mM, vazão 0,6mL/min, 60ºC, volume de injeção 20 µL, coluna Aminex HPX 87H e detector de IR (Waters).

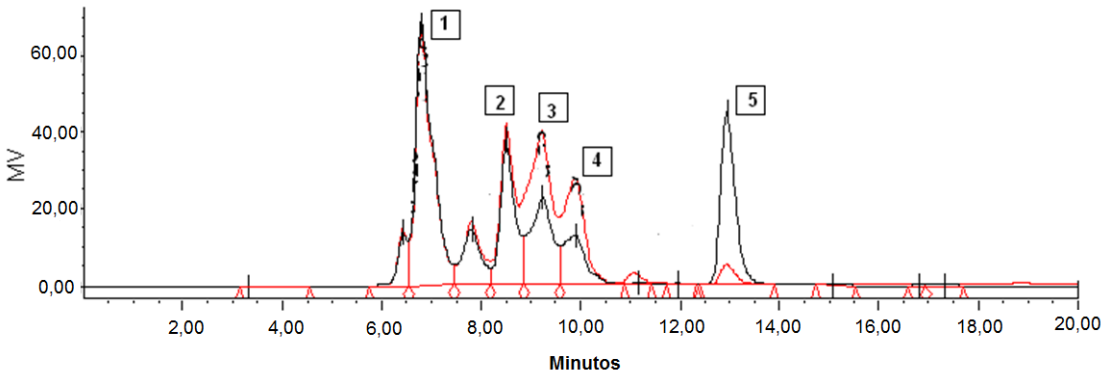


Figura 27: Sobreposição dos picos de EHS (vermelho) e EHFS (preto) (1-estaquiose; 2-rafinose; 3-glicose; 4-sacarose e 5- ácido lático). Fase móvel H2SO4 5mM, vazão 0,6mL/min, 60ºC, volume de injeção 20 µL, coluna Aminex HPX 87H e detector de IR (Waters).

Como pode ser observada no cromatograma da Figura 27 e nos resultados da Tabela 14, apenas a concentração de estaquiose se manteve constante no EHS e no EHFS indicando que não houve o consumo deste oligossacarídeo pelas cepas utilizadas para a fermentação do EHS. Os demais açúcares foram consumidos em proporções diferentes sendo, 13% da rafinose, 50% da glicose e 49% da sacarose presentes no EHS.

Tabela 14: Concentração de rafinose, estaquiose e ácido lático (g/100g) no EHS e EHFS medidos em HPLC.

	Rafinose g/100g amostra	**Estaquiose** g/ 100g amostra	**Ácido Lático** g/100g amostra	**Glicose** g/100g amostra	**Sacarose** g/100g amostra
EHS	0,31	1,70	0,08	9,31	1,34
EHFS	0,27	1,70	0,83	4,70	0,65

Segundo Mital e Steinkraus (1975), que estudaram a utilização de oligossacarídeos por bactérias láticas produtoras de α-galaoctosidase, determinadas cepas de *Lactobacillus acidophilus* são eficazes no uso de estaquiose e de rafinose como fontes de carbono.

Em outro trabalho, Pithong e colaboradores (1980) mostraram que *L. acidophilus* cresce bem no extrato de soja devido à utilização eficiente da sacarose, enquanto *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* não cresce rapidamente sem suplementação de glicose e extrato de leveduras, embora diminua levemente o teor de estaquiose com um correspondente aumento no teor de rafinose e sacarose.

De acordo com os resultados obtidos para a quantificação do ácido lático no EHS e no EHFS é possível observar um aumento da concentração deste ácido, de 0,08% para 0,83%, em função do processo de fermentação. A concentração final de ácido lático foi de 0,83 g ácido lático/100g (EHFS), está dentro do valor indicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a concentração final de ácido lático em iogurte a qual deve estar entre 0,6-1,5% (BRASIL, 2000). Portanto, o EHFS se enquadra nos padrões de acidez estabelecidos para iogurte e demais bebidas lácteas fermentadas.

5.3 – Avaliação da viabilidade das culturas láticas durante a vida de prateleira do produto.

A viabilidade da cultura mista comercial de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* utilizada na produção do EHFS foi avaliada considerando três diferentes concentrações de gomas, como exposto anteriormente na Tabela 8 (ver 4.2.1.3). As colônias cresceram em Agar MRS e foram quantificadas após 48 horas de incubação a 36ºC em anaerobiose (Figura 28).

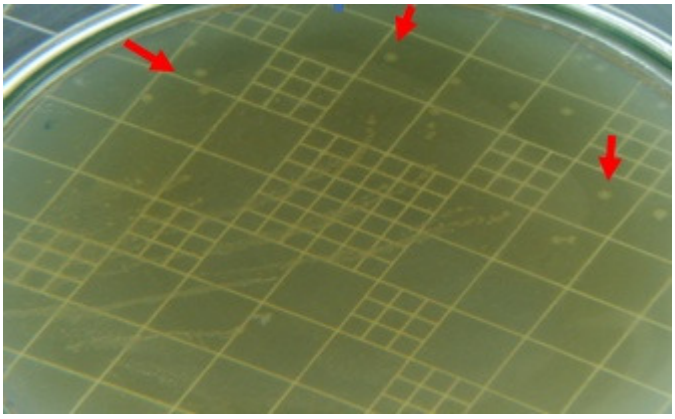


Figura 28: Placa para contagem de bactérias láticas em Agar MRS.

Na Tabela 15 estão os resultados das contagens de bactérias láticas para as amostras de EHFS nos diferentes tempos de armazenamento, 0, 15 e 30 dias. É possível observar que o controle (sem adição de gomas) e a amostra 1* (0,20% guar + 0,20% xantana), após 30 dias de armazenamento sob refrigeração de 8ºC a 10ºC, tiveram uma redução das contagem em 1 ciclo logarítmico. Inicialmente com contagem ao redor de 10^7 UFC/mL, ao final do período estudado apresentaram contagem na grandeza de 10^6 UFC/mL.

Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004), em trabalho realizado para avaliação da viabilidade de bebida láctea fermentada por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*, também relataram a redução de 1 ciclo logarítmico na contagem de bactérias láticas ao longo de 21 dias de armazenamento a 4ºC, com redução de 10^8 UFC/mL para 10^7 UFC/mL.

As amostras 2* e 3* com 0,25% de guar + 0,25% de xantana e 0,30% de guar + 0,30% de xantana, respectivamente, apresentaram contagem na ordem de 10^8

UFC/mL no primeiro dia de análise a qual após 30 dias de armazenamento foi reduzida em 2 ciclos logarítmicos.

Tabela 15 – Contagem de células em EHFS, utilizando Agar MRS, durante tempo de armazenamento de 30 dias.

Tempo de armazenamento (dias)	Contagem de Bactérias Láticas (UFC mL^{-1})
Controle	
0	$2,0 \times 10^7$
15	$9,0 \times 10^6$
30	$3,7 \times 10^6$
Amostra 1*	
0	$3,9 \times 10^7$
15	-
30	$4,7 \times 10^6$
Amostra 2*	
0	$1,8 \times 10^8$
15	-
30	$3,2 \times 10^6$
Amostra 3*	
0	$2,2 \times 10^8$
15	$2,3 \times 10^6$
30	$3,4 \times 10^6$

- ocorreu contaminação das placas não permitindo contagem

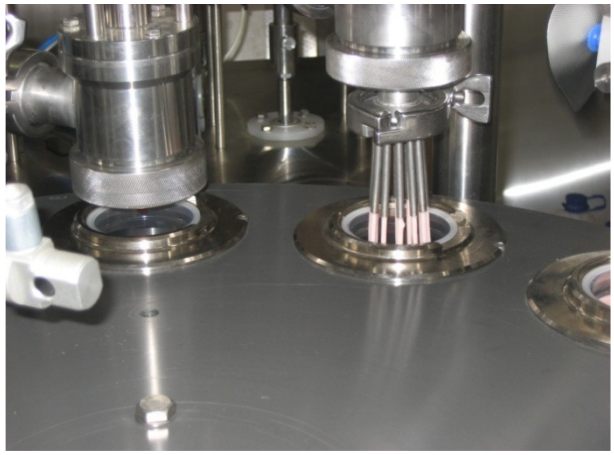
Não foi possível identificar a influência da adição das gomas na viabilidade dos micro-organismos presentes no EHFS visto que, ao final do período de armazenamento, as amostras acrescidas de goma (1*, 2* e 3*) e a amostra controle apresentaram valores muito próximos de contagem de bactérias láticas. É possível que outros fatores como temperatura e a acidez sejam mais efetivos sobre a viabilidade da cultura do que a presença das gomas nas concentrações estudadas.

De acordo com Oliveira e colaboradores (2002), diversos fatores afetam a viabilidade dos micro-organismos probióticos em produtos lácteos fermentados, entre eles a cepa, a pós-acidificação, a composição da co-cultura e a presença de fatores de crescimento do leite. Afirmam ainda que baixos valores de pH inibem o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento de *L. acidophilus* e são nocivos para as células bacterianas, reduzindo sua viabilidade.

Apesar da redução da contagem bacteriana evidenciada na Tabela 14, todas as amostras apresentaram-se em conformidade com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas (BRASIL, 2000) que estabelece o valor mínimo de 10^6 UFC/mL de bactérias láticas em bebidas lácteas fermentadas, durante o tempo de armazenamento estabelecido de 30 dias.

5.4 – Teste na Indústria

Foi realizada produção do EHFS na Ecobras para ser usado em teste com o equipamento para envase do produto. Para tal foram utilizadas goma guar e goma xantana na concentração de 0,25% cada e o EHFS acrescentado de açúcar, aroma natural de morando e corante carmim de cochonilha. Também foi utilizado um preparado de morango para produção de iogurte tipo *sundae*, com doce de frutas na base.



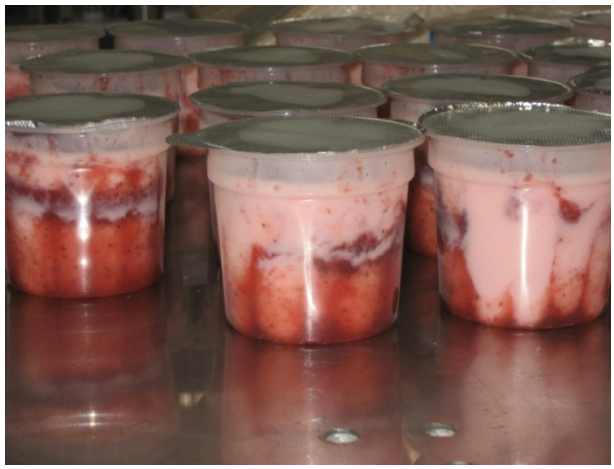


Figura 29: Processo de envase de EHFS em planta industrial

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

A estabilização do EHFS pela utilização dos hidrocolóides goma xantana, goma guar, carragena e alginato de sódio foi eficiente. A combinação de ambas parece não promover o efeito sinérgico buscado na estabilidade dos produtos.

Os resultados obtidos indicam uma possível influencia das concentrações dos hidrocolóides no processo de estabilização em função da formação da rede polimérica.

Dentro dos sistemas estudados, pode-se determinar como adequados o uso de 0,20% a 0,50% goma guar e/ou 0,20% a 0,30 % goma xantana. Os hidrocolóides carragena e alginato de sódio não se mostraram adequados para estabilização do EHFS.

Tanto a amostra controle (sem adição de hidrocolóides) como concentrações inferiores a 0,2% de goma xantana apresentaram perda de estabilidade tanto por difusão molecular como por coalescência.

A Análise Digital de Imagem é um método eficiente para avaliar a estabilidade de EHFS, permitindo identificar a presença de processos de instabilidade ainda não perceptíveis visualmente.

O processo de fermentação do EHFS com a cultura mista de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*, ocorreu apenas com o consumo dos açúcares presentes na soja, sem a necessidade de enriquecimento com fonte de carbono externa. Estas bactérias láticas usaram preferencialmente a glicose e sacarose, mas também foram capazes de metabolizar a rafinose, oligossacarídeo não digerível no trato gastrointestinal humano. A produção de ácido lático (0,83 %) foi satisfatória, alcançando a concentração obtida em leites fermentados e iogurtes.

Quanto à viabilidade das bactérias láticas, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus,* durante a vida de prateleira do produto, o EHFS adicionado ou não de gomas apresentou-se dentro dos padrões determinados para leites fermentados. A presença de gomas parece não interferir na viabilidade da cultura láctea.

CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

O estudo da fermentação do extrato de soja com culturas lácteas é um processo novo, com poucos produtos existentes no mercado, especialmente no brasileiro e, portanto, ainda há muito a ser desenvolvido.

Como continuidade a este trabalho segue algumas sugestões:

- ✓ Avaliar sensorialmente os ensaios deste trabalho que foram efetivamente estabilizados pela adição de gomas, para determinar que concentração é preferida sensorialmente;
- ✓ Determinar o *shelf life* microbiológico, em complemento à informação de bactérias láticas viáveis, e o *shelf life* sensorial;
- ✓ Estudar e avaliar o emprego de outros hidrocolóides na estabilização do EHFS;
- ✓ Estudar o comportamento reológico das emulsões de EHFS adicionadas de gomas, ao longo do tempo de armazenamento;
- ✓ Avaliar o consumo de oligossacarídeos e produção de ácido lático ao longo do tempo de fermentação do EHS;
- ✓ Avaliar se o enriquecimento do EHS com sacarose favorece a fermentação, reduzindo o tempo do processo.

CAPÍTULO 8 – TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Estudo da estabilidade de extrato de soja fermentado orgânico acrescido de hidrocolóides naturais. Thiana Esteves, Mariana Miguez, Maria Alice Zarur Coelho e Maria Helena Rocha Leão. XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 02 a 05 de agosto de 2009, Natal – RN.

Avaliação dos teores de rafinose e estaquiose em extrato hidrossolúvel de soja e extrato hidrossolúvel de soja fermentado. Roberta Ribeiro, Thiana Esteves, Maria Alice Zarur Coelho e Maria Helena Rocha Leão. XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 07 a 10 de novembro de 2010, Salvador – BA.

CAPÍTULO 9 – BIBLIOGRAFIA

ADETUNJI, O.A. *et al*, Effect of some selected processing routes on the nutritional value of soy yoghurt, *Journal of applied sciences* 6(3): 527-530,2006.

ALLRED, C. D. *et al*, Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. *Carcinogenesis* 25 (9): 1649-1657, (2004).

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

ARBOS *et al*, Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(2): 501-506, abr.-jun. 2010.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n. 3, p.431-439, 2004.

BENAVENTE-GARCIA, O., *et al*. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*. v.68, p. 457-462, 1999.

BOWLES, S.; DEMIATE, I.M. Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p. 652-659, jul/set. 2006.

BORGUINII, R.G.; TORRES, E.A.F.S.; Alimentos Orgânicos: Qualidade Nutritiva e Segurança do Alimento, Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, 13(2): 64-75, 2006.

BOTTEON, P.T.L. *et al*, Concentrações plasmáticas de triptamina, tiramina e feniletilamina em eqüinos sob efeitos de sobrecarga de carboidratos e antiinflamatórios não esteroidais, *Pesq. Vet. Bras*. 28(6):299-302, junho 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 16, DE 11 DE JUNHO DE 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Secretaria de Política Agrícola – SPA Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA, Cadeia Produtiva de Produtos Orgânicos v. 5, 108 p., 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta SRF/TSE nº 574, de 8 de dezembro de 1998. INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 36, DE 31 DE OUTUBRO DE 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Ministério da Saúde. INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA MAPA/MS Nº 18, DE 28 DE MAIO DE 2009.

BRASIL. Poder Executivo Federal. DECRETO Nº 6.323, DE 27 DE DEZEMBRO DE 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 398, DE 30 DE ABRIL DE 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO Nº 18, DE 30 DE ABRIL DE 1999.

BRUM, A.A.S. (2010) Proteínas vegetais. Disponível em: <http//:www.farmabio.k6.com.br> Acesso em 20/08/2010.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA.* v. 29, n. 2, p. 193- 203, 2005.

CASÉ F. *et al*. Produção de "leite" de soja enriquecido com cálcio. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 25: 86-91, 2005.

CHANG, J.H. *et al*, Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi, *Journal of Applied Microbiology* 109 (2010) 220–230, 2010.

CIABOTTI, S. *et al*, Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. *Ciência Agrotecnológica*, v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006.

COULTATE, T.P. Alimentos: a química de seus componentes. 3 . Ed. Porto Alegre: Artmed, 368p, 2004.

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, n.2, p.490-496, 2009.

DALEPRANE, J.B.; PACHECO, J.T.; BOAVENTURA, G.T. Evaluation of protein quality from genetically modified an organic soybean in two consecutives generations of wistar rats. *Braz. Arch. Biol. Technol*. Vol. 52, n.4, 841-847, 2009.

DIAZ, P.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. Reologia de Xantana: uma Revisao sobre a Influencia de Eletrolitos na Viscosidade de Solucoes Aquosas de Gomas Xantana. Seminario: Ciencias Exatas e Tecnologicas, Londrina, v. 25, n.1, p. 15-28, 2004.

DONKOR, O.N. *et al*, Survival and activity of selected probiotic organism in set-type yogurt during cold storage. *Int. Dairy J*. 17: 657-665, 2007.

EL-SAYED, E.M. *et al*, Utilization of laboratory-produced xanthan gum in the manufacture of yogurt and soy yogurt. *Europe Food Research Technology*, v.215, p.298-304, 2002.

EMBRAPA. Soja: Diferentes usos grão. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29>. Acesso em 23 de março de 2011.

Estabilizantes. *Revista Food Ingredients Brasil,* nº14, 2010. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materiais/145.pdf.

ESTADOS UNIDOS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2011. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em 9 de fevereiro de 2011.

FAVARO TRINDADE, C.S.; TERZI, S.C.; TRUGO, L.C.; DELLA MODESTA, R.C.; COURI, S. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. *Arch. Lationamer. de Nutr*. v. 51, n. 1, 2001.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e prática. 2ª ed. Porto alegre: Editora Artmed, 601p, 2006.

FERRAGUT, V. *et al*, Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk, *Journal of Food Engineering*, 63–69, 92, 2009.

FREIRE, M.G., *et al*; Aging Mechanisms of Perfluorocarbon Emulsions using Image Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 286, 224-232, 2005.

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

GARCIA, M.M.T, Avaliação da estabilidade do extrato hidrossolúvel de soja enriquecido de cálcio e vitaminas C e D através do processamento digital de imagens. Rio de Janeiro, 2008, 114 f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química - UFRJ, 2008.

GODOY, R.C.B; ANTUNES, P.L.; ZONTA, E.P.. Estabilização de néctar de goiaba (*Psidium guayava L.*) com gomas xantana, carragena e amido ceroso. *Ver. Bras. De Agrociência,* vol. 2, n.2, PP.105-110, mai-ago, 1998.

GOLDFLUS, F; CECCANTINI, M; SANTOS, W. Amino acid content of soybean samples collected in different Brazilian states: harvest 2003/2004. *Rev. Bras. Cienc. Avic*. [online]. 2006, vol.8, n.2, pp. 105-111.

HAULY, M.C.O.; FUCHS, R.H.B.; FERREIRA, S.H.P.; Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Rev. Nutrição*, Campinas, v.18, n.5, set./out. 2005.

IICA. Caderno de Estatísticas do Agronegócio Brasileiro (4º trimestre/2009). 101 p. 2009.

KHURANA, H. K.; KANAWJIA, S. K. Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition and Food Science* 3: 91–108, 2007.

KIM, S.; KIM, W.; HWANG, I.K.; Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. *International Journal of Food Science and Technology* 38 (3), 337–342, 2003.

LAZZARI, R. *et al*. Diferentes fontes proteicas para a alimentação do jundiá (Rhamdia quelen). Cienc. Rural, Santa Maria. v. 36, n. 1, p. 240-246, 2006.

LOPES, R. M., *et al*. Flavonóides. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*. p. 18-22, 2003.

LORENZO, G.; ZARITZKYN, N.; CALIFANO, A. Modeling rheological properties of low-in-fat o/w emulsions stabilized with xanthan/guar mixture. *Food Research International*, v.41, p.487-494, 2008.

LUCEY, J.A. The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, v.15, p.603-608,2001.

MARUYAMA, L.Y. *et al*, Textura instrumental de queijo "petit-suisse" potencialmente probiótico: Influência de diferentes combinações de gomas, *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 26(2): 386-393, abr.-jun. 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions; principles, practice, and techniques.
Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. *et al*. Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(6), 577-606, 2009.

MIGUEZ, M.M.T.G. Avaliação da estabilidade do extrato hidrossolúvel de soja enriquecido de cálcio e vitaminas c e d através do processamento digital de imagens, Rio de Janeiro, 2008, 93f. Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências, UFRJ/EQ, 2008.

MITAL, B. K.; STEINKRAUS, K. H. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soymilk. *Journal of Food Science* 40, 114 – 118, 1975.

MORAES *et al*, Alimentos funcionais e nutracênicos: Definições, legislação e benefícios à saúde, *Revista Eletrônica de Farmácia*, Vol 3(2), 109-122, 2006.

MORETTI, B.R., Efeito da suplementação do leite com proteínas de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição da cultura lática em iogurtes, São José do Rio Preto, 2009, 160f. Dissertação de Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2009.

MUNHOZ *et al*, Influencia de hidrocolóides na textura de gele de amido de milho, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(3): 403-406, jul.-set. 2004.

MUNRO, I. C. Soy isoflavones: A safety reviews. *Internacional Life Sciences Institute. Nutrition Reviews.* v. 61, n. 1, p. 1-33, 2003.

NIKAEDO, P.H.L.; AMARAL, F. F.; PENNA, A. L. B. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 3, p. 397-404, 2004.

NILSEN. Consumers, Retailers – and the Organic Market. National Organic Food Conference, 2008.

NILSEN. Os Produtos Mais Quentes do Mundo: Informações sobre o crescimento de categorias de alimentos e bebidas em 2004, 2004.

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G. *et al*. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo *in natura.* Ciênc. *Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.26, n.1, p. 159-165, jan.-mar., 2006.

OLIVEIRA, L.B. Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas e nas características físico-quimicas de leite fermentado simbiótico, São Caetano do Sul, 2008, 104f. Dissertação Mestrado Engenharia de Processos Químicos e Bioquimicos, Escola de Engenharia Mauá, 2008.

OLIVEIRA, M.N. *et al*. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

PEREIRA, C.A.S.; OLIVEIRA, F.B. Soja, alimento e saúde: valor nutricional e preparo. 1.ed. Viçosa: Editora UFV, 102p., 2004.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Editora Varella, 14p , 2005.

PINTHONG, R., MACRAE, R., ROTHWELL, J. The development of soya-based yoghurt. I Acid production by lactic acid bacteria. II Sensory evaluation and analysis of volatiles. *Journal of Food and Technology* 15, 647 – 659, 1980.

RASTALL,R.A., Prebiotics and Probiotics Science and Technology, (Eds) D. Charalampopoulos; xxiv, 1265 p. 2009.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. Critical Reviews in *Food Science and Nutrition*, v. 40, n. 6, p. 461-480, 2000.

ROUDSARI *et al*, Assessment of soy phytoestrogens' effects on bone turnover indicators in menopausal women with osteopenia in Iran: a beforeand after clinical Trial, *Nutrition Journal* 2005, 4:30, 2005.

RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. Media for the enumeration of yoghurt bacteria. *Int. Dairy J.*, v.6, 839-850, 1996.

SABA, A.; MESSINA, F.; Food Quality and Preference 14 (2003), Attitudes towards organic foods and risk/benefit perception associated with pesticides, 637–645, 2002.

SANTIAGO, L.G. *et al*, The influence of xanthan and λ-carrageenan on the creaming and flocculation of an oil-in-water emulsion containing soy protein. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.19, nº4, p. 411-417, 2002.

SARKAR, S. "Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt: A review", *British Food Journal*, Vol. 110 Iss: 7, pp.717 – 740, 2008.

SCHULZ, C.K., Tratamento de Efluentes Oleosos utilizando Processos de Separação por Membranas, Rio de Janeiro, 2005, 146 f. Dissertação de Doutorado em ciências em Engenharia Química, COPPE/UFRJ, 2005.

SILVA, K.A., Emulsões para molhos de salada determinada por processamento digital de imagens. Rio de Janeiro, 2008, 110 f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Química – UFRJ, 2008.

SILVA, K.A.; ROCHA-LEÃO, M.H.; COELHO, M.A.Z., Evaluation of aging mechanisms of olive oil–lemon juice emulsion through digital image analysis. *Journal of Food Engineering* v. 97, p. 335-340, 2010.

SOUZA, A.R.; RODRIGUEZ, G.O.B.; ZANPHORLIN, L.M., Hidrólise enzimática da proteína de soja isolada por protease extraída do látex da planta *Euphorbia millii. V EPCT- Encontro de Produção Científica e Tecnológica,Campo Mourão, PR,* 2010. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_34826640803.pdf>. Acesso em 09/03/2011.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA.*v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SINGH, M.; Yadav, R. K.; Verma, H. S. Volumetric and viscometric behaviour of soya bean and gram proteins in aqueous methotrexate (anticancer drug) solution at 298.15 to 308.15K, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (12), pp. 1807–1820, 17 June 2008.

SONAGLIO, D.; PETROVICK, P.R.; BAS, V.L.;Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoolico de ACHYROCLIINE SATUREIIOIIDES (LAM.) DC., Compositae (MARCELA): comparação entre cromatografia liquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta Organic Foods, *Journal of Food Science* R117 R124, Vol. 71, Nr. 9, 2006.

SCHULZ, C.K., Tratamento de Efluentes Oleosos utilizando Processos de Separação por Membranas, Rio de Janeiro, 2005, 146 f. Dissertação de Doutorado em ciências em Engenharia Química, COPPE/UFRJ, 2005.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental FCF/USP, 2008. Disponível em: < http://www.fcf.usp.br/tabela/ > Acesso em 19/02/2011.

TELES, C.D; FLÔRES, S.H; Influência da adição de espessantes e leite em pó nas características reológicas do iogurte desnatado, B.CEPPA, Curitiba v. 25, n. 2, p. 247-256 jul./dez. 2007.

The Merk Index, Ninth Edition, 1976.

TONELI, J. T.C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.7, p.181-204, 2005.

TORTORA, G.J.F; BERDELL, R.C.; CHRISTINE, L., Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 894p. ISBN: 85-363-0488-X, 2005.

TUITEMWONG, P. e TUITEMWONG, K., Development of flatulent-free and high quality soy yoghurt and frozen soy yoghurt with Bifidobacteria. 2003 http://www.agriqua.doae.go.th/worldfermentedfood/P9_Tuitemwong.pdf

VIEIRA, H.B. *et al*, Gestão ambiental em propriedade rural dedicado a produção de canola para geração de biodiesel na região de passo fundo, 5^0 Congresso Internacional de BIOENERGIA, Curitiba, PR, 2010.

UMBELINO, D.C.; CARDELLO, H.M.A.B.; ROSSI. E.A. Efeito de diferentes sais de ferro sobre as características sensoriais do “iogurte” de soja. *Archivos Latino americanos de Nutricion*. v. 51, nº2, p.199-202, 2001.

WINTER, C.K. , DAVIS, S.F., Organic Foods, Journal of Food Science, 44-48, 2006. Disponível em: < http://www.ift.org > Acesso em 17/03/2011.

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, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(4): 674-679, out.-dez. 2004.