



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

#

SUZANA TIEMI MATSUBARA

**BEBIDA FERMENTADA À BASE DE SOJA COM GÉRMEN
DE SOJA E *Lactobacillus reuteri***

Londrina
2014

SUZANA TIEMI MATSUBARA

**BEBIDA FERMENTADA À BASE DE SOJA COM GÉRMEN
DE SOJA E *Lactobacillus reuteri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Sandra Garcia

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M434b Matsubara, Suzana Tiemi.
Bebida fermentada à base de soja com gérmen de soja e
Lactobacillus reuteri / Suzana Tiemi Matsubara. – Londrina, 2014.
84 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência de Alimentos, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Produtos – Teses. 2. Bebidas fermentadas – Teses. 3.
Isoflavonas – Teses. 4. Alimentos funcionais – Teses. 5. Antioxidantes
– Teses. 6. *Lactobacillus reuteri* – Teses. I. Garcia, Sandra. II.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 663.1

SUZANA TIEMI MATSUBARA

**BEBIDA FERMENTADA À BASE DE SOJA COM GÉRMEN
DE SOJA E *Lactobacillus reuteri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora. Prof^a Dr^a Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Silvana Pedroso de Góes-Favoni
Fundação de Apoio à Tecnologia e Ciência –
FATEC

Prof^a Dr^a Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 07 de agosto de 2014.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Sandra Garcia, pelos ensinamentos, paciência, apoio e amizade manifestados ao longo do mestrado, que foram primordiais na condução e na realização deste trabalho.

À professora Dr^a Elza Louko Ida e Dr^a Josemeiry Bonifácio da Silva, pelos ensinamentos, disponibilidade e auxílio no uso do CLUE.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, minha gratidão por todo o aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Sementes Paraná Ltda, Herborisa Indústria e Comércio Ltda, e Clericci-Sacco®, pela colaboração e fornecimento das matérias-primas utilizadas nos experimentos.

Às técnicas de laboratório Alessandra Cristina Silva, Patrícia Sambatti e Elza Youssef, pela paciência, presteza e amizade.

Aos doutorandos Marsilvio Lima de Moraes Filho, Fernando Sanches de Lima, Karla Bigetti Guergoletto e Leniza Januário Ludwig, pelo companheirismo, amizade e principalmente pelos ensinamentos e auxílio.

Às doutorandas Marli Busanello e Cintia Ladeira Handa, e às mestrandas Naiara Ramos Ricardo, Melissa Ferrari Pagnan, Bruna Yumi Yoshida e Marcela Colombo dos Santos pelo apoio, amizade, carinho e companheirismo.

Aos demais colegas e amigos, mestrandos ou doutorandos, pela companhia constante durante a semana, finais de semana ou feriados, tornando os dias no laboratório mais leves e alegres.

AGRADECIMENTO PESSOAL

À Deus, pelo amparo e pela força, os quais foram imprescindíveis na superação dos momentos de dificuldades e incertezas.

Aos meus pais, Militão Takeshi Matsubara e Alice Keiko Kikuchi Matsubara, pelo apoio incondicional ao longo desses anos.

Ao meu irmão, Wander Hissao Matsubara, pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia de Londrina, pelo apoio e compreensão manifestados durante a execução deste trabalho.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade”.

Albert Einstein

MATSUBARA, Suzana Tiemi. **Bebida fermentada à base de soja com gérmen de soja e *Lactobacillus reuteri***. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

A soja é considerada um alimento funcional por conter fitoquímicos, como as isoflavonas, que são bioativos no organismo humano. As isoflavonas estão concentradas principalmente no gérmen da soja. As bactérias probióticas são utilizadas no processo fermentativo de alimentos, e quando são consumidas numa concentração de 8-9 log UFC por porção diária, podem promover benefícios à saúde humana. O objetivo do trabalho foi formular e caracterizar uma bebida fermentada de soja com propriedades funcionais. Foi utilizado extrato de soja da cultivar BRS 257, adicionado de 3% (m/v) de gérmen de soja e 4% (v/v) de *Lactobacillus reuteri*, e fermentado a 36 °C por 24 h. O extrato fermentado, com (EGFA) ou sem (EGF) adição de 12% (m/m) de sacarose, foi estudado durante o armazenamento a 4 °C por 30 dias, e foram realizados contagens de células viáveis em ágar MRS, pH, acidez titulável, determinação e quantificação de isoflavonas por CLUE, quantificação de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu e de capacidade antioxidante por sequestro de radicais DPPH· e ABTS+, além das análises de composição centesimal, e de aceitação sensorial de EGFA por escala hedônica. O EGF apresentou valores de 4,56% de proteínas, 2,07% de lipídios, 1,98% de carboidratos e 0,51% de cinzas, superiores ao EGFA, exceto pelo teor de lipídios e de carboidratos. Além disso, o EGF exibiu contagens de probióticos viáveis de $8,30 \pm 0,04$ log UFC.g⁻¹, atendendo a legislação brasileira, pH de $3,29 \pm 0,03$ e acidez titulável de $0,89 \pm 0,03$ g ácido láctico.100 g⁻¹ de produto, no final do período de estocagem. Para o EGFA, os valores encontrados foram, respectivamente, $7,80 \pm 0,13$ log UFC.g⁻¹, $3,19 \pm 0,09$ e $0,91 \pm 0,02$ g ácido láctico.100 g⁻¹ de produto. Em relação às isoflavonas, o EGF mostrou maior conteúdo de isoflavonas totais ($15,74 \pm 0,02$ mg.g⁻¹) e presença de glicitina. O conteúdo de fenólicos totais encontrado para EGF também foi maior ($273,40 \pm 0,77$ mg EAG.100 g⁻¹). Após os cálculos, foi constatado que 100 g de EGF e de EGFA concentram, respectivamente, 155,35 mg (67,66 mg de isoflavonas agliconas) e 100,35 mg (43,45 mg de agliconas) de isoflavonas totais. Quanto à atividade antioxidante, o EGF apresentou aumento significativo ($p \leq 0,05$) após 15 dias de armazenamento, e o EGFA mostrou estabilidade ao longo dos 30 dias. Por fim, o EGFA obteve nota média de $5,31 \pm 1,83$ para o atributo sensorial de aceitação global. Concluiu-se que o produto fermentado apresenta propriedades nutritivas, microbiológicas e funcionais adequadas, estabilidade por 30 dias e aceitação global igual a 5,31 (não gostei, nem desgostei).

Palavras-chave: Probióticos. Isoflavonas. Antioxidante. Alimento funcional.

MATSUBARA, Suzana Tiemi. **Fermented soy drink with soy germ and *Lactobacillus reuteri***. 2014. Dissertation (Master of Food Science – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Soybeans are considered a functional food because contain phytochemicals such as isoflavones, which are bioactive to the human body. Isoflavones are concentrated mainly in soy germ. Probiotics are used in the fermentation of foods, and when they are consumed in a concentration of 8-9 log CFU per daily portion, may promote human health benefits. The aim was to formulate and characterize a fermented soy drink with functional properties. The soymilk from BRS 257 soybeans with 3% (w/v) of soy germ and 4% (v/v) of *Lactobacillus reuteri*, and fermented at 36 °C for 24 h, was used. The fermented soy germ-soymilk, with (FSS) or without (FS) 12% (w/w) of sucrose, was studied during storage at 4 °C for 30 days, and viable cell counts on MRS agar, pH, titratable acidity, determination and quantification of isoflavones by UPLC, quantification of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu and antioxidant activity by scavenging of radicals DPPH· and ABTS·+ were performed, in addition to the analyzes of proximate composition and sensory acceptance of FSS by hedonic scale. The FS showed values of 4.56% protein, 2.07% fat, 1.98% carbohydrate and 0.51% ash, higher than the FSS except for fat and carbohydrate. In addition, the FS exhibited viable probiotics counts of 8.30 ± 0.04 log CFU.g⁻¹ in accordance with Brazilian regulation, pH of 3.29 ± 0.03 and titratable acidity of 0.89 ± 0.03 g lactic acid.100 g⁻¹ at the end of storage. For FSS, the values were, respectively, 7.80 ± 0.13 log CFU.g⁻¹, 3.19 ± 0.09 and 0.91 ± 0.02 g of lactic acid.100 g⁻¹. Regarding the isoflavones, FS showed the highest content of total isoflavones (15.74 ± 0.02 mg g⁻¹), and presence of glycitin. The total phenolic content found for FS was also higher (273.40 ± 0.77 mg GAE.100 g⁻¹). After the calculations, it was found that 100 g of FS and FSS contain, respectively, 155.35 mg (67.66 mg isoflavone aglicone) and 100.35 mg (43.45 mg isoflavone aglicone) total isoflavones. For antioxidant activity, the FS increased significantly ($p \leq 0.05$) after 15 days of storage, and FSS showed stability over the 30 days. Finally, the FSS had an average score of 5.31 ± 1.83 for the sensory attribute of overall acceptance. It was concluded that the fermented product has nutritional, microbiological and functional properties, stability for 30 days and overall acceptance equal to 5.31 (neither liked nor disliked).

Key words: Probiotic. Isoflavones. Antioxidant. Functional food.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Via de produção de reuterina por <i>L. reuteri</i>	18
FIGURA 2 – Estrutura química das isoflavonas da soja.....	21
FIGURA 3 – Estrutura química da isoflavona e de 17- β -estradiol	22
FIGURA 4 – Estrutura química da genisteína e seus conjugados indicando os estágios de degradação ou metabolismo	22
FIGURA 5 – Fluxograma para obtenção do extrato de soja	31
FIGURA 6 – Obtenção do produto fermentado de soja.....	32
FIGURA 7 – Formulação da bebida fermentada	33
FIGURA 8 – Valores observados e valores preditos para contagem de <i>L. reuteri</i> em extrato fermentado com gérmen de soja.....	46
FIGURA 9 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da temperatura e do tempo para contagem de células viáveis de <i>L. reuteri</i>	47
FIGURA 10 – Valores observados e valores preditos para teor de isoflavonas agliconas em extrato fermentado com gérmen de soja	49
FIGURA 11 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da temperatura e do tempo para teor de isoflavonas agliconas.....	49
FIGURA 12 – Porcentagem de respostas para teste sensorial de aceitação de bebida fermentada de soja com escala hedônica de 9 pontos	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Variáveis independentes e níveis de variação do DCCR para fermentação do extrato de soja adicionado de gérmen de soja.....	30
TABELA 2 – DCCR para fermentação do extrato de soja adicionado de gérmen de soja	30
TABELA 3 – Composição centesimal dos grãos de soja BRS 257 e do gérmen de soja (Isosoy®).....	40
TABELA 4 – Valores médios* de isoflavonas do grão de soja cultivar BRS 257, das frações do grão (hipocótilo e cotilédone) e do gérmen de soja (Isosoy®).....	42
TABELA 5 – Matriz do DCCR 22 e funções-respostas: y1 (contagem de células viáveis) e y2 (teor de isoflavonas agliconas).....	45
TABELA 6 – Efeitos estimados e coeficientes de regressão para a variável resposta contagem de células viáveis de <i>L. reuteri</i>	45
TABELA 7 – ANOVA para contagem de células viáveis de <i>L. reuteri</i>	46
TABELA 8 – Efeitos estimados e coeficientes de regressão para a resposta teor de isoflavonas agliconas	48
TABELA 9 – ANOVA para teor de isoflavonas agliconas	49
TABELA 10 – Composição centesimal do ES, EF, EGF e EGFA.....	51
TABELA 11 – Valores médios* de isoflavonas totais do ES, EF, EGF e EGFA, ao 1º, 15º e 30º dia de armazenamento a 4 °C	52
TABELA 12 – Valores médios* de compostos fenólicos e capacidade antioxidante por sequestro de DPPH· e ABTS+· para grão de soja BRS 257, gérmen de soja (Isosoy®), extratos fermentados adicionados ou não de gérmen de soja, ao 1º, 15º e 30º dia de armazenamento a 4 °C	55
TABELA 13 – Valores de contagem de células viáveis de <i>L. reuteri</i> , pH e acidez titulável para extratos fermentados adicionados ou não de gérmen de soja, ao 1º, 15º e 30º dia de armazenamento a 4 °C	58

TABELA 14 – Análise de perfil de textura de EF, EGF e EGFA	59
TABELA 15 – Escores de avaliação sensorial para bebida à base de soja com gérmen de soja e <i>L. reuteri</i>	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	15
3.1.1	Probióticos.....	16
3.1.1.1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	17
3.2	SOJA	19
3.2.1	Isoflavonas	20
3.2.2	Gérmen de Soja	24
3.2.3	Extrato de Soja	25
3.3	FERMENTAÇÃO DE DERIVADOS DA SOJA.....	25
3.3.1	Fermentação do extrato de soja	26
3.3.2	Fermentação do gérmen de soja.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAIS	29
4.1.1	Soja	29
4.1.2	Gérmen de Soja	29
4.1.3	Cultura Probiótica	29
4.2	MÉTODOS	29
4.2.1	Delineamento Experimental.....	29
4.2.2	Obtenção do Extrato de Soja.....	31
4.2.3	Preparo do Inóculo e Manutenção da Cultura	31
4.2.4	Adição de Gérmen de Soja e Fermentação do Extrato de Soja	32
4.2.5	Formulação da Bebida	32
4.2.6	Determinação do pH.....	33
4.2.7	Determinação da Acidez Titulável	33
4.2.8	Contagem de <i>Lactobacillus reuteri</i>	34

4.2.9	Avaliação da Composição Centesimal	34
4.2.10	Determinação e Quantificação do Perfil de Isoflavonas por CLUE.....	34
4.2.11	Determinação de Fenólicos Totais	35
4.2.12	Determinação da Capacidade Antioxidante: Sequestro de Radicais DPPH	36
4.2.13	Determinação da Capacidade Antioxidante: Sequestro de Radicais ABTS+·	37
4.2.14	Análise de Perfil de Textura.....	37
4.2.15	Análise das Condições Higiênico-Sanitárias	37
4.2.16	Análise Sensorial	38
4.2.17	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Composição Centesimal do Grão e do Gérmen de Soja.....	40
5.2	Quantificação das Isoflavonas do Grão e do Gérmen de Soja.....	41
5.3	Planejamento Experimental.....	44
5.4	Composição Centesimal de Extratos Fermentados e Não Fermentado	50
5.5	Quantificação das Isoflavonas de Extratos Fermentados e Não Fermentado	51
5.6	Compostos Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante.....	54
5.7	Contagem de Células Viáveis, pH e Acidez Titulável	57
5.8	Análise de Perfil de Textura.....	59
5.9	Análise Sensorial.....	60
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais, além de fornecer nutrientes básicos, podem exercer ação positiva em uma ou mais funções do organismo, atuando na promoção da saúde e na prevenção de doenças. Um alimento largamente produzido no Brasil e considerado funcional é a soja. A soja possui alto valor nutricional, é rica em proteína, possui aminoácidos essenciais e contém compostos químicos que são bioativos no organismo humano. Entre esses fitoquímicos estão as isoflavonas, encontradas em diferentes partes do grão mas concentradas principalmente no gérmen da soja. Após serem ingeridas, as isoflavonas sofrem biotransformação pelas bactérias colônicas, liberando as formas agliconas que, por semelhança estrutural com o hormônio estrógeno, mimetizam a ação hormonal e auxiliam na redução de doenças associadas à desregulação dos níveis estrogênicos. As agliconas podem atuar também como antioxidantes, prevenindo o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas.

A fermentação de derivados da soja por bactérias lácticas tem o potencial de melhorar as características nutricionais, sensoriais e de estabilidade do produto, contribuindo para maior aceitação pelo consumidor e para o aumento da vida de prateleira. Essas bactérias podem sintetizar a enzima β -glicosidase, responsável pela conversão das isoflavonas glicosídicas da soja em agliconas. Os *Lactobacillus reuteri* são espécies de bactérias lácticas consideradas probióticas, ou seja, quando ingeridas em quantidades adequadas são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, de colonizar o intestino e modular a microbiota entérica, atuando contra as desordens do organismo e exercendo efeitos positivos para a saúde e para o bem-estar do indivíduo. A inserção de probióticos em produtos de origem vegetal tem sido amplamente estudada, visando incrementar o mercado de alimentos funcionais com alto valor agregado.

O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar físico-química, sensorial e microbiologicamente bebida fermentada com cultura probiótica à base de extrato e gérmen de soja.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e caracterizar bebida funcional à base de extrato e gérmen de soja, fermentada com cultura probiótica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as melhores condições (temperatura e tempo) de crescimento do *L. reuteri* em extrato de soja com gérmen de soja;
- Caracterizar o produto quanto à composição centesimal, perfil de textura, contagem de células viáveis, acidez titulável, conteúdo de compostos bioativos (fenólicos totais e isoflavonas) e capacidade antioxidante;
- Avaliar a estabilidade química e microbiológica do produto armazenado a 4 °C durante 30 dias;
- Avaliar a aceitabilidade sensorial da bebida fermentada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Por definição, alimento funcional é aquele que além de possuir os nutrientes adequados demonstra ter ação benéfica sobre uma ou mais funções-alvo do organismo, de maneira relevante na manutenção da saúde, no bem-estar do indivíduo e/ou na redução do risco de doenças (ROBERFROID, 2002).

São alimentos frescos ou processados, cuja presença natural ou não de compostos bioativos, quando incorporados na dieta convencional, pode trazer benefícios fisiológicos específicos, corrigindo distúrbios metabólicos, regulando as funções do organismo e auxiliando na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (WALZEM, 2004; CÂNDIDO; CAMPOS, 2005).

O conceito surgiu no Japão na década de 80, após o governo japonês financiar projetos de pesquisa relacionados à influência da alimentação na saúde humana, com o intuito de promover benefícios, reduzir os custos médicos e melhorar a qualidade de vida da população de idosos. Os estudos apontaram que as doenças crônicas possuem origem multifatorial, muitas delas associadas à dieta do indivíduo, tornando os alimentos em alvos de pesquisas relacionadas às diversas enfermidades (ARAI et al., 2001; HENRY, 2010).

O Japão foi o pioneiro na produção e comercialização de alimentos funcionais, denominados FOSHU (*Foods for Specified Health Use* – alimentos para uso específico de saúde), regulamentados a partir de 1997. Cerca de 500 tipos de produtos funcionais já são comercializados no país, porém a investigação de compostos bioativos nos alimentos ainda continua em razão da capacidade promissora de beneficiar as funções do organismo (ARAI et al., 2001; CHEN et al., 2012).

No Brasil, os alimentos funcionais são regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA com base na legislação instituída em 1999, que determina os critérios de avaliação da segurança, do risco e da adequação das propriedades funcionais alegadas ao alimento, não sendo permitida referência à prevenção, tratamento ou cura de doenças. As resoluções

brasileiras relativas ao assunto são: ANVISA/MS 16/99, 17/99, 18/99, 19/99 e 02/2002 (BRASIL, 1999a, 1999b, 1999c, 1999d; BRASIL, 2002).

3.1.1 Probióticos

O termo probiótico refere-se ao micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidade adequada, confere benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). A palavra significa “pró-vida” e reflete os efeitos dos probióticos na melhora e no equilíbrio das funções do trato gastrointestinal e do sistema imune, reduzindo os riscos de desenvolvimento de doenças como câncer e dislipidemias (SINGH et al., 2011).

Os micro-organismos considerados probióticos não são patogênicos ou tóxicos, devem ser estáveis durante a fabricação e o armazenamento do produto alimentício no qual foram inseridos, devem ser capazes de resistir às condições gástricas e intestinais, mantendo-se viáveis para que possam exercer influência positiva na saúde humana ou animal (MARTEAU; SEKSIK; JIAN, 2002).

O mecanismo de ação dos probióticos envolve a modificação do pH intestinal, produção de compostos antimicrobianos, competição por sítios de ligação, por nutrientes ou fatores de crescimento que inibem o crescimento de micro-organismos patógenos invasivos, e estímulo de células imunomodulatórias. Os probióticos atuam na função de barreira da mucosa e estabilizam a permeabilidade intestinal, contribuindo no tratamento de diarreias, gastroenterites, colites, alergias alimentares, entre outros (SINGH et al., 2011).

Segundo a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (CTCAF-ANVISA), a quantidade mínima adequada de probióticos viáveis para que exerça benefícios à saúde deve estar situada na faixa de 8-9 log UFC por porção diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2002; 2008).

Os probióticos podem ser bactérias, bolores ou leveduras, tradicionalmente utilizados em produtos lácteos. Contudo, estudos têm investigado a inserção de probióticos em matrizes de cereais ou vegetais para o desenvolvimento de novos produtos funcionais (PRADO et al., 2008; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

A maioria das bactérias probióticas pertence ao grupo das bactérias ácido-láticas, sendo veiculadas em iogurtes, leites e outros alimentos fermentados (PARVEZ et al., 2006; SINGH et al., 2011). Dentre as BAL, os *Lactobacillus reuteri* têm sido considerados promissores para o consumo humano, em razão da funcionalidade fisiológica demonstrada por ensaios clínicos *in vivo* e das características que permitem que sejam incorporados aos alimentos funcionais.

3.1.1.1 *Lactobacillus reuteri*

Os *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e imóveis. Apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 37 e 42 °C, e em pH em torno de 6,5. São anaeróbias facultativas, sendo normalmente cultivadas em condições com oxigênio limitado (SINKIEWICZ, 2010).

Pertencem ao grupo das bactérias heterofermentativas, produtoras de ácido lático, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, entre outros, durante a fermentação da glicose. A produção e a liberação de metabólitos, como ácidos graxos de cadeia curta e de substâncias antimicrobianas, permitem que *L. reuteri* tenha um efeito inibidor no crescimento de determinados micro-organismos (SPINLER et al., 2008; SINKIEWICZ, 2010).

Quando cultivado em condições anaeróbias, em meio contendo glicerol, *L. reuteri* possui a habilidade de sintetizar e liberar a reuterina (Figura 1) (SINKIEWICZ, 2010), uma mistura de isômeros do 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), que possui ação de inibição bacteriana de largo espectro (TALARICO; DOBROGOSZ, 1990; CLEUSIX et al., 2007).

A reuterina pode reduzir a carga de micro-organismos indesejáveis no trato gastrointestinal (patógenos) ou nos alimentos (deteriorantes), tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, fungos ou protozoários, sendo útil como coadjuvante terapêutico contra infecções ou como preservante de alimentos (DOLEYRES et al., 2005; SPINLER et al., 2008).

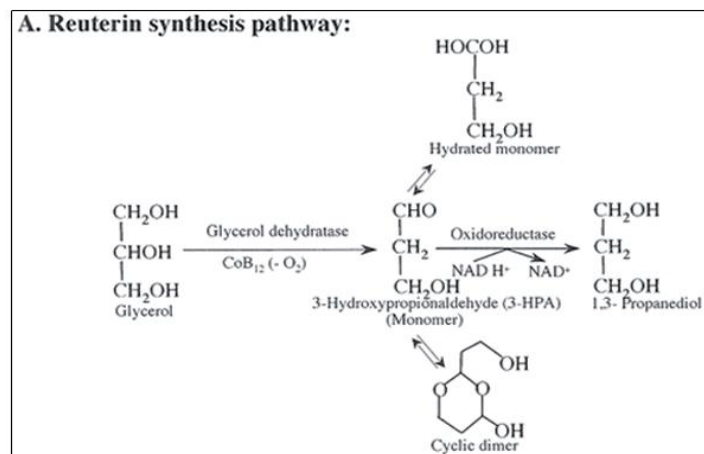


Figura 1 - Via de produção de reuterina por *L. reuteri*. **Fonte:** SINKIEWICZ, 2010.

L. reuteri é habitante natural do trato gastrointestinal de humanos, suínos, frangos e outros animais vertebrados ou mamíferos (DOLEYRES et al., 2005). Possui resistência *in vitro* em ambientes com pH inferiores a 2,5 e tolerância a sais biliares, condições que assemelham-se às encontradas no estômago e no intestino delgado, indicando viabilidade no organismo após a passagem pelo trato digestivo (PATEL et al., 2004).

A sobrevivência de *L. reuteri* no trato gastrointestinal foi demonstrada em um estudo *in vivo*, no qual foi administrada uma dose diária de 8,6 log UFC de *L. reuteri* durante vinte e oito dias em voluntários saudáveis, e após esse período foi observada a colonização significativa pelo *L. reuteri* no duodeno, estômago e íleo, além de alterações significativas e positivas na resposta imune da mucosa gastrointestinal (VALEUR et al., 2004).

Em outros estudos, foi observada que a suplementação diária de 8,3-8,6 log UFC de *L. reuteri* contribuiu com reduções de: frequência e intensidade dos efeitos colaterais associados à antibioticoterapia utilizada contra infecção por *Helicobacter pylori* em humanos (LIONETTI et al., 2006), intensidade da dor abdominal em crianças de 6-16 anos de idade com diagnóstico de dor abdominal funcional (ROMANO et al., 2010), e frequência, duração e recrudescência da diarreia aguda em crianças de 6-36 meses de idade hospitalizadas (FRANCAVILLA et al., 2012).

Em estudos clínicos, foi constatado que a dose diária de 8 log UFC de *L. reuteri* é bem tolerada, segura e eficaz, tanto para o homem saudável quanto para crianças, recém-nascidos ou pessoas imunodeficientes (SHORNIKOVA et

al., 1997; WOLF et al., 1998; WEIZMAN; ALSHEIKH, 2006; SAVINO et al., 2007; DOMMELS et al., 2009; FRANCAVILLA et al., 2012). Além disso, foi comprovado que o iogurte formulado com 10 log UFC de *L. reuteri* microencapsulados é seguro para o consumo humano (JONES et al., 2012).

Dessa forma, a inserção de *L. reuteri* em alimentos funcionais revela-se promissora, por ser apontado como probiótico seguro, eficaz e com efeitos positivos na promoção da saúde humana.

3.2 SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], nativa da China, tem sido tradicionalmente utilizada como alimento em países orientais. Japão, China, Coréia e Sudeste Asiático consomem produtos à base de soja, nas formas de extrato, tofu e molho fermentado (LIU, 1997).

A soja foi introduzida no ocidente em 1765, e a partir de 1910 o cultivo de soja passou a ser relevante para a rotação de culturas, como método de fixação de nitrogênio e recuperação do solo. Posteriormente, a soja foi cultivada para fins de extração de óleo, alimentação animal (aves e peixes) e fabricação de biocombustível (CHEN et al., 2012). Até meados de 1990, a ingestão de produtos de soja se restringia aos descendentes de orientais, vegetarianos, crianças ou adultos intolerantes à lactose ou alérgicos às proteínas de origem animal (LIU, 1997; MESSINA, 2010).

Classificada como uma das cinco principais fontes nutricionais de proteínas (carne, leite, ovo, queijo, soja), sendo a única de origem vegetal, a soja tem sido pouco utilizada como alimento no Ocidente devido ao sabor e aroma relatados como semelhantes ao feijão cru (*beany flavor*), atribuídos à ação das enzimas lipoxigenases sobre ácidos graxos polinsaturados, que formam conjugados de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados, e conferem o sabor indesejável (ROBINSON et al., 1995). Entretanto, medidas tecnológicas têm sido empregadas na tentativa de reduzir a atividade enzimática e o sabor desagradável dos grãos, tais como melhoramento genético e tratamento térmico (branqueamento), visando maior aceitação dos produtos derivados da soja pelos consumidores (OKUBO et al., 1992; CIABOTTI et al., 2007).

Além da importância nutricional, a partir da década de 90 os compostos fitoquímicos da soja despertaram atenção no ponto de vista funcional. Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado que a baixa incidência de doenças crônicas na população asiática está associada ao consumo a longo prazo de derivados da soja, e esse fato deve-se à presença de fitoestrógenos com similaridade estrutural ao hormônio estrógeno humano (SETCHELL, 1998).

Os fitoestrógenos, em particular as isoflavonas, são conhecidos por mimetizar a ação hormonal e reduzir a incidência de doenças e sintomas relacionados à desregulação do estrógeno no organismo (osteoporose, hiperlipidemia, câncer de mama, sintomas indesejáveis do climatério) (SETCHELL, 1998).

Outros compostos bioativos presentes na soja (inibidores de protease, ácidos fenólicos, lignanas, fitoesteróis e saponinas), e o efeito sinérgico entre eles, foram associados à diminuição do desenvolvimento de doenças (CHO, 2010). Assim, em razão da composição química, das propriedades nutricionais e funcionais, e do auxílio na prevenção e no tratamento de doenças, existe uma nova e forte demanda pelos produtos derivados da soja (MESSINA, 2010).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014), a produção brasileira de soja estimada para a safra 13/14 é de 86,08 milhões de toneladas, mantendo o país como um dos cinco maiores produtores mundiais (Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e Índia), e como o segundo maior exportador mundial (Estados Unidos em primeiro) (USDA-WASDE, 2013). O Estado do Paraná, com produção estimada de 34,79 milhões de toneladas para a safra 12/13, figura como o segundo maior produtor entre os estados brasileiros, perdendo apenas para o Mato Grosso (46,06 milhões toneladas) (CONAB, 2014).

3.2.1 Isoflavonas

As isoflavonas pertencem à classe dos flavonoides, do grupo dos compostos polifenólicos. São sintetizadas como fitoalexinas e estocadas em vacúolos celulares de plantas leguminosas, em resposta ao estímulo fisiológico provocado por agentes infecciosos ou às condições estressantes durante o cultivo da planta (NOGUCHI et al., 2007; VAMERALI et al., 2012). As

isoflavonas são encontradas nos cotilédones e no hipocótilo do grão da soja, em concentrações que variam entre 0,1 a 5 mg.g⁻¹ de soja, conforme o genótipo e as condições ambientais enfrentadas durante a maturação da semente (LIU, 1997; LOZOVAYA et al., 2005).

As formas das isoflavonas da soja são: β -glicosídeos (daidzina, genistina e gliciteína), acetil glicosídeos (6''-O-acetil-daidzina, 6''-O-acetil-genistina e 6''-O-acetil-gliciteína), malonil glicosídeos (6''-O-malonil-daidzina, 6''-O-malonil-genistina e 6''-O-malonil-gliciteína) e agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) (Figura 2) (WISEMAN et al., 2002; ROSTAGNO et al., 2009).

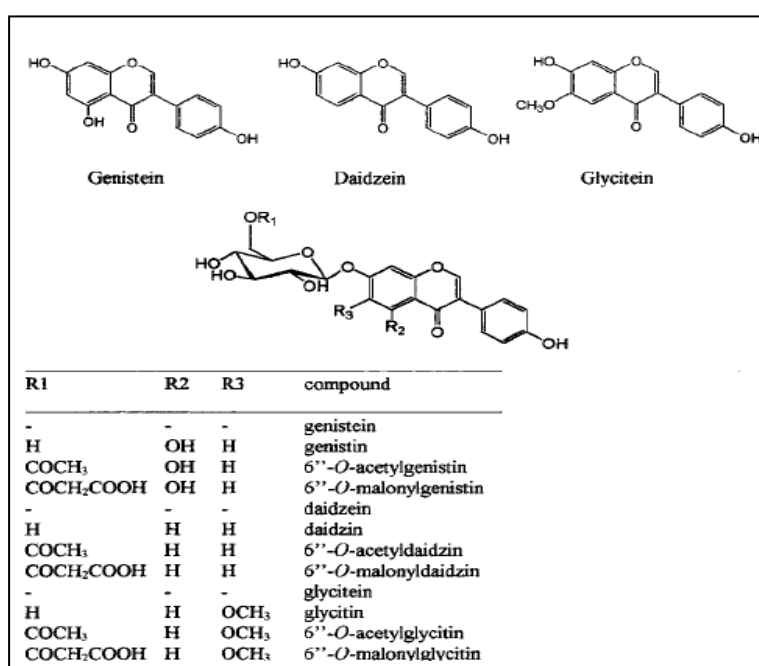


Figura 2 - Estrutura química das isoflavonas da soja. **Fonte:** WISEMAN et al., 2002.

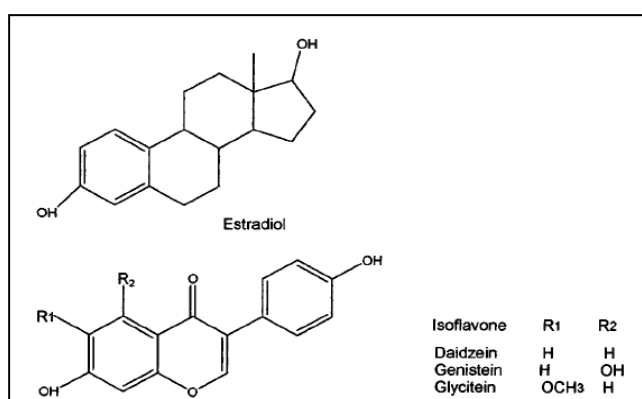


Figura 3 - Estrutura química da isoflavona e de 17- β -estradiol.

Fonte: SONG; HENDRICH; MURPHY, 1999.

As isoflavonas são compostos bioativos, possuem semelhança estrutural com a molécula 17- β -estradiol (Figura 3) e propriedade de ligação aos receptores estrogênicos. Dessa forma, podem mimetizar a ação hormonal do estrógeno, exercendo efeitos celulares mais fracos, e atuar na prevenção ou no tratamento de doenças hormônio relacionadas (SETCHELL, 1998).

O conteúdo de isoflavonas em derivados da soja varia em virtude da cultivar de soja e do processamento utilizados na elaboração do produto. Em grãos de soja *in natura* e em produtos processados prevalecem as isoflavonas daidzina e genistina (CHUN; KIM; KIM, 2008). Malonil e acetil glicosídeos são suscetíveis ao tratamento térmico elevado, sendo convertidos em β -glicosídeos. Já as agliconas são encontradas frequentemente em produtos fermentados (Figura 4) (SETCHELL, 1998).

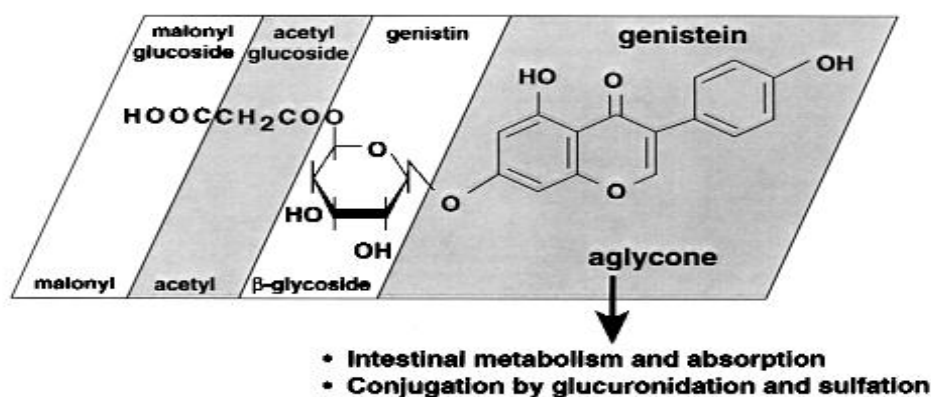


Figura 4 - Estrutura química da genisteína e seus conjugados indicando os estágios de degradação ou metabolismo. **Fonte:** SETCHELL, 1998.

No organismo, as isoflavonas glicosídicas sofrem ação das enzimas β -glicosidases produzidas pelas bactérias intestinais, liberando as formas agliconas que são absorvidas pelas células entéricas e metabolizadas no fígado (YUAN et al., 2012). Às agliconas são atribuídas as atividades biológicas e funcionais das isoflavonas, pois elas são absorvidas pelo intestino em maior quantidade e com maior rapidez que os glicosídeos, e possuem maior potencial de ação estrogênica (CHEN et al., 2012).

A metabolização das isoflavonas no organismo depende da microbiota intestinal, e mudanças no balanço bacteriano podem afetar na disponibilidade das isoflavonas (CHOI et al., 2007; CHUN; KIM; KIM, 2008). Por isso, as

diferenças interindividuais da microbiota entérica podem explicar em parte os diversos efeitos biológicos observados após o consumo da soja, pois é através da ação bacteriana que as isoflavonas são biotransformadas em metabólitos mais ativos (VERGNE et al., 2007; WONG et al., 2012).

O *Food and Drug Administration* (FDA), em 1999, aprovou a alegação que o consumo diário de 25 g de proteína de soja, associado à alimentação equilibrada, pode reduzir os níveis séricos de colesterol total, e que tal efeito pode estar relacionado à presença de isoflavonas, cujo conteúdo é de 1-2 mg.g⁻¹ de proteína de soja.

Estima-se que, entre idosos chineses e japoneses, o consumo de isoflavonas em alimentos de soja seja em média 40 mg/dia, enquanto entre norte-americanos e europeus o consumo não seja maior que 3 mg/dia (MESSINA, 2010). Não há um consenso estabelecido a respeito da dose mínima diária de isoflavonas que forneça efeitos positivos à saúde, e não há o reconhecimento pelos órgãos regulamentadores que a ingestão de isoflavonas está associada à prevenção e redução de determinadas doenças, ainda que existam evidências observadas em pesquisas e apresentadas pela comunidade científica.

Os estudos apontam que as isoflavonas conferem benefícios significativos e não causam prejuízos ao organismo, quando incorporadas a longo prazo na dieta (SETCHELL, 1998). Um estudo clínico realizado durante 2 anos com mulheres saudáveis no climatério, com suplementação diária de 80-120 mg de isoflavonas derivadas do hipocótilo de soja, mostrou que o risco de desenvolvimento de cânceres, como de mama e de endométrio, não está relacionado ao consumo frequente de isoflavonas (STEINBERG et al., 2011).

Diversos estudos clínicos e epidemiológicos têm relatado serem menores os riscos de incidência e recorrência do câncer de mama em mulheres asiáticas na pós-menopausa (DONG; QIN, 2011; CHO et al., 2010), em razão de mudanças epigenéticas que resultam em expressão de genes reguladores nas células de proliferação e de diferenciação do tecido epitelial mamário. Essas mudanças foram relacionadas ao consumo moderado de soja ao longo da vida, exemplo da dieta asiática (HILAKIVI-CLARKE; ANDRADE; HELFERICH, 2010).

O mecanismo de ação das isoflavonas na supressão de tumores pode não ser exclusivamente hormonal. Os fitoestrógenos exibem atividade antioxidante, antiproliferativa e antiangiogênica, inibindo a ação de citocinas e de fatores de crescimento (SETCHELL, 1998). Dessa forma, as isoflavonas podem inibir ou modular o crescimento de células cancerígenas, como as células prostáticas (WANG et al., 2009a; DE SOUZA et al., 2010). Além disso, as isoflavonas possuem atividade antioxidante contra o oxigênio ativo, impedindo a oxidação de moléculas, atuando na redução do colesterol total e da fração LDL, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares, e evitando os danos teciduais característicos nas doenças crônicas da senilidade (LIU, 1997; RÜFER; KULLING, 2006; WONG et al., 2012).

3.2.2 Gérmen de Soja

O grão de soja consiste em três partes básicas: casca, cotilédones e embrião. O embrião representa apenas 2% do peso total da semente, é constituído por epicótilo, hipocótilo e radícula, e conhecido comercialmente como gérmen de soja (LIU, 1997).

O gérmen concentra naturalmente 6-10 vezes mais isoflavonas totais que os cotilédones, com perfil de isoflavonas diferenciado (HUBERT et al., 2008). Os teores de daidzeína e gliciteína encontrados no gérmen são maiores que em outras partes do grão, e devido ao potencial estrogênico relativo das agliconas (gliciteína > genisteína > daidzeína), o gérmen pode ser utilizado como tratamento alternativo de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa (STEINBERG et al., 2011) ou como coadjuvante terapêutico no tratamento de doenças (SONG et al., 1998; SONG; HENDRICH; MURPHY, 1999; WISEMAN et al., 2002). A administração de glicitina, e posterior biotransformação em gliciteína, resultou em redução da perda óssea e da hiperlipidemia em fêmeas de camundongos sem ovários (UESUGI et al., 2001).

A composição centesimal média do gérmen de soja é 38,4% proteínas, 9,2% lipídios, 43,3% carboidratos, 4,9% umidade e 4,2% cinzas. Além do valor nutricional e da presença de isoflavonas, o gérmen contém outros compostos bioativos com propriedades antioxidantes, como fitoesteróis, tocoferóis e saponinas (HSU et al., 2007; KIM et al., 2013). Por ser fonte de nutrientes e de

fitoquímicos, o gérmen de soja tem sido valorizado como matéria-prima na exploração de isoflavonas e no enriquecimento de alimentos funcionais (HUBERT et al., 2008; WISEMAN et al., 2002).

3.2.3 Extrato de Soja

Segundo a definição do Instituto Adolfo Lutz (2008), o extrato de soja é “produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais”. O extrato pode ser consumido na forma direta ou indireta, como bebida ou como ingrediente na elaboração de alimentos.

Com proteínas de origem vegetal e aminoácidos essenciais, e ausência de colesterol, glúten e lactose, o extrato de soja atende às exigências nutricionais de pessoas com diferentes restrições alimentares. Após a industrialização do extrato, com a incorporação de flavorizantes ou polpa de frutas, foram maiores a aceitação e o consumo do produto pela população ocidental, devido ao sabor característico de soja menos acentuado (LIU, 1997).

Em média, 100 mL de extrato de soja fornecem 52 calorias, 2,5% carboidratos, 3,4% proteínas, 2,3% lipídios, 40 mg de cálcio, 105 mg de potássio, 1,2 mg de ferro, 40 mg de vitamina B₁ e 120 mg de vitamina B₂ (EMBRAPA, 2012).

3.3 FERMENTAÇÃO DE DERIVADOS DE SOJA

A fermentação é um antigo método empregado na conservação e na melhoria da qualidade sensorial dos alimentos. Alimentos fermentados possuem aroma e sabor acentuados, melhor textura e maior vida de prateleira. Além disso, podem conferir benefícios ao organismo em virtude do aumento do teor vitamínico, melhora da digestibilidade e oferta de compostos bioativos resultantes do metabolismo microbiano (CHEN, 2012).

Os alimentos à base de soja são divididos em duas categorias: os não fermentados (grão, broto, farinha, extrato, *tofu*, *okara*) e os fermentados (*misso*, molho de soja, *natto*, *tempeh*) (CHEN, 2012). Os micro-organismos usualmente

empregados nos produtos fermentados da soja são os fungos e as bactérias, em especial as bactérias ácido-láticas.

Bactérias ácido-láticas (BAL), por definição, são aquelas cujo produto final da metabolização de açúcares é o ácido láctico (lactato), que possui ação acidulante, conservante e flavorizante nos alimentos. Os principais gêneros de BAL utilizados na fermentação da soja são os *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (LIU, 2003; RAIMONDI et al., 2009).

As BAL são capazes de sintetizar a enzima α -galactosidase, que realiza a hidrólise das moléculas de estaquiase e rafinose da soja (WANG et al., 2003). Após a ingestão, esses carboidratos não são completamente degradados pelo sistema digestivo, sendo portanto metabolizados pelas bactérias intestinais, com formação de gases e gerando desconfortos como distensão abdominal e cólica (LIU, 1997). Alimentos fermentados de soja apresentam teores reduzidos de rafinose e estaquiase, evitando os efeitos indesejáveis após o consumo (LIU; CHEN; LIN, 2005; CHUN; KIM; KIM, 2008).

Alguns gêneros de BAL isolados de fezes humanas (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Weissella*) apresentam atividade de enzima β -glicosidase. Essa enzima é responsável pela hidrólise das isoflavonas glicosídicas da soja, tanto no organismo quanto nos produtos, elevando a disponibilidade das isoflavonas agliconas (CHUN; KIM; KIM, 2008).

Derivados de soja fermentados por BAL tem mostrado maior conteúdo de isoflavonas agliconas quando comparado com os não fermentados. As agliconas podem auxiliar na estabilidade do produto, uma vez que elas possuem propriedades antioxidantes (CHEN, 2012; CASSIDY et al., 2006; IZUMI et al., 2000; WANG; MURPHY, 1996). Dessa forma, a aplicação de BAL em alimentos de soja tem sido considerada interessante por conferir benefícios ao produto e ao organismo humano (CHIEN; HUANG; CHOU, 2006; OTIENO; SHAH, 2007; CHUN; KIM; KIM, 2008; DONKOR; SHAH, 2008; DING; SHAH, 2010; REKHA; VIJAYALAKSHMI, 2011; CHEN, 2012).

3.3.1 Fermentação do extrato de soja

O extrato de soja tem sido apontado como substrato promissor em alimentos funcionais, pois contém fitoquímicos oriundos do grão da soja e

nutrientes que possibilitam o crescimento de bactérias probióticas, resultando na liberação de metabólitos que beneficiam a saúde humana. O extrato fermentado por BAL produtoras de β -glicosidase apresenta maior teor de isoflavonas agliconas, que são mais bioativas que as isoflavonas glicosídicas (CHUN et al., 2008; CHAMPAGNE et al., 2009).

O crescimento de BAL em extrato de soja é considerado satisfatório, com contagens de células viáveis acima de $8 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ e estabilidade durante o período de estocagem. No extrato de soja fermentado, o teor de ácido láctico produzido por BAL é menor do que quando cultivadas em leite animal, no entanto essa diferença não prejudica a qualidade final do produto (YUAN et al., 2012).

A fermentação de extrato de soja por BAL contribui com a redução do *beany flavour*, sabor característico e indesejável dos derivados da soja. A melhora sensorial do extrato possibilita uma maior aceitação pelos consumidores não habituados ao consumo de produtos de soja (CHAMPAGNE et al., 2009).

3.3.2 Fermentação do gérmen de soja

Por ser fonte de compostos bioativos, o gérmen de soja tem sido considerado um ingrediente interessante para o desenvolvimento de alimentos funcionais. O gérmen concentra naturalmente teores de isoflavonas, saponinas do grupo A e B, tocoferóis e outros fitoquímicos que apresentam atividade antioxidante sem prejuízo do processo fermentativo (BARBOSA et al., 2006; HUBERT et al., 2008).

Em um estudo com extrato de gérmen de soja fermentado por BAL, Hubert et al. (2008) mostraram que, após 48 horas de incubação, o extrato exibiu mudanças no perfil de isoflavonas e de saponinas, com aumento do teor de isoflavonas agliconas e maior atividade antioxidante quando comparado com o extrato de gérmen não fermentado. Tsangalis et al. (2004) relataram que a incubação de *Bifidobacterium animalis* Bb-12 em extrato de gérmen de soja, combinado com proteína isolada de soja, resultou em contagens máximas de $8 \log \text{UFC.mL}^{-1}$. De Boever, Deplancke e Verstraete (2001) observaram a

presença de isoflavonas agliconas após fermentação de gérmen de soja com *L. reuteri*.

Embora seja uma fração do grão de soja contendo compostos com propriedades antioxidantes e antiproliferativas, o gérmen ainda é visto como um subproduto da indústria da soja. Entretanto, a fermentação do gérmen de soja com bactérias probióticas tem mostrado potencial e resultados promissores, despertando o interesse pela aplicação do gérmen aos alimentos funcionais (HUBERT et al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Soja

Para a elaboração do extrato de soja (ES) foram utilizados grãos de soja da cultivar BRS 257 (livre de lipoxigenases), safra 2011/12, fornecidos pela empresa Sementes Paraná Ltda., Mauá da Serra - Pr.

4.1.2 Gérmen de Soja

Para a aplicação do gérmen de soja foi utilizado o produto comercial Iso soy[®] em pó, fornecido pela empresa Herborisa Indústria e Comércio Ltda., Londrina - PR.

4.1.3 Cultura Probiótica

Para a fermentação foi utilizada a cultura comercial liofilizada, Lyofast LR-92, composta por linhagem de *Lactobacillus reuteri*, fornecida pela empresa Clericci-Sacco[®], Cadorago - Itália.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Delineamento Experimental

Os experimentos foram conduzidos conforme o delineamento composto central rotacional (DCCR) (*Central Composite Rotatable Design – CCRD*), com duas variáveis independentes contendo dois níveis cada (fatorial 2²) e 3 replicatas no ponto central (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). As variáveis independentes (temperatura e tempo de incubação) e os níveis de variação (codificados e reais), estabelecidos conforme experimentos prévios, estão apresentados na Tabela 1. O DCCR foi conduzido em 2 blocos, sendo o primeiro formado por 7 ensaios (4 pontos fatoriais e 3 repetições do ponto

central) e o segundo bloco formado por outros 7 ensaios (4 pontos axiais e 3 repetições do ponto central) para otimização, totalizando 14 ensaios (Tabela 2). Foram observadas duas variáveis respostas: contagem de células viáveis de *L. reuteri* (log UFC.g⁻¹) e conteúdo de isoflavonas agliconas (mg.g⁻¹).

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação do DCCR para fermentação do extrato de soja adicionado de gérmen de soja

Variáveis independentes	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
Temperatura de incubação (°C)	30,36	32	36	40	41,64
Tempo de incubação (h)	12,72	16	24	32	35,28

Tabela 2 - DCCR para fermentação do extrato de soja adicionado de gérmen de soja

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais	
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
1	-1	-1	32	16
2	+1	-1	40	16
3	-1	+1	32	32
4	+1	+1	40	32
5	0	0	36	24
6	0	0	36	24
7	0	0	36	24
8	-α	0	30,36	24
9	+α	0	41,64	24
10	0	-α	36	12,72
11	0	+α	36	35,28
12	0	0	36	24
13	0	0	36	24
14	0	0	36	24

4.2.2 Obtenção do Extrato de Soja

O extrato de soja (ES) foi obtido de acordo com os procedimentos descritos por Rosenthal et al. (2003), Couri et al. (2006) e Ciabotti et al. (2006), com algumas modificações. O processo consiste nas operações de seleção dos grãos, pesagem, branqueamento, trituração, separação do resíduo por filtragem e tratamento térmico do extrato.

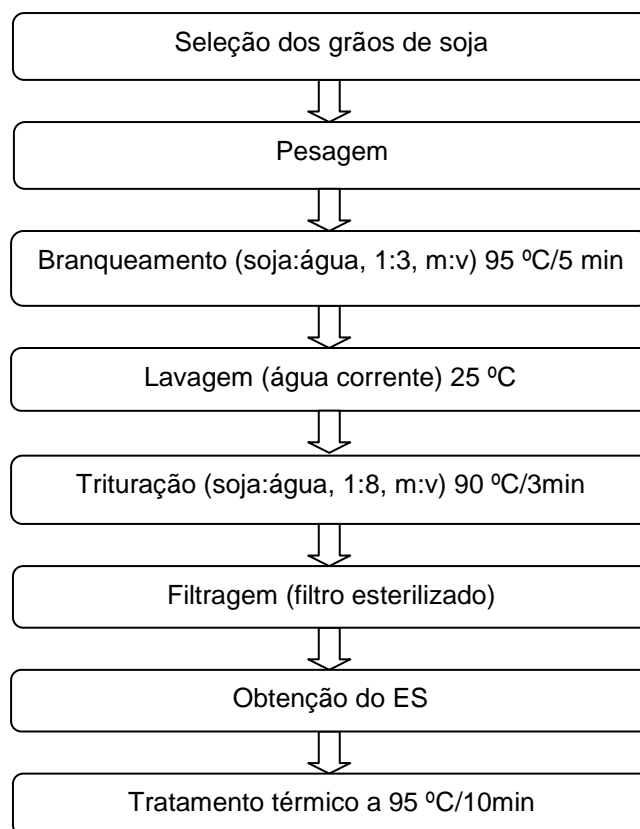


Figura 5 - Fluxograma para obtenção do extrato de soja

4.2.3 Preparo do Inóculo e Manutenção da Cultura

Para o inóculo, 1 g de cultura liofilizada de *Lactobacillus reuteri* foi disposto em 1 L de ES esterilizado (121 °C/15 min). Após homogeneização, o ES foi dividido em porções de 10 mL, e 10% (v/v) de glicerol esterilizado foi adicionado às porções. As alíquotas foram mantidas a -20 °C, até o momento do uso (DOLEYRES et al., 2005).

4.2.4 Adição de gérmen de soja e fermentação do ES

Para os 14 ensaios, descritos no item 4.2.1, a proporção de gérmen de soja adicionado ao ES foi de 3% (m/v). Após homogeneização, tratamento térmico a 95 °C e resfriamento a 30 °C, cada ensaio recebeu 4% (v/v) do inóculo de *L. reuteri*, resultando em uma contagem inicial aproximada de células viáveis de 5 log UFC.g⁻¹. Os ensaios foram incubados sem agitação conforme o delineamento experimental (Tabela 2). Ao término da fermentação, foram determinados nas amostras a contagem de células viáveis de *L. reuteri* e o conteúdo de isoflavonas agliconas (Figura 6).

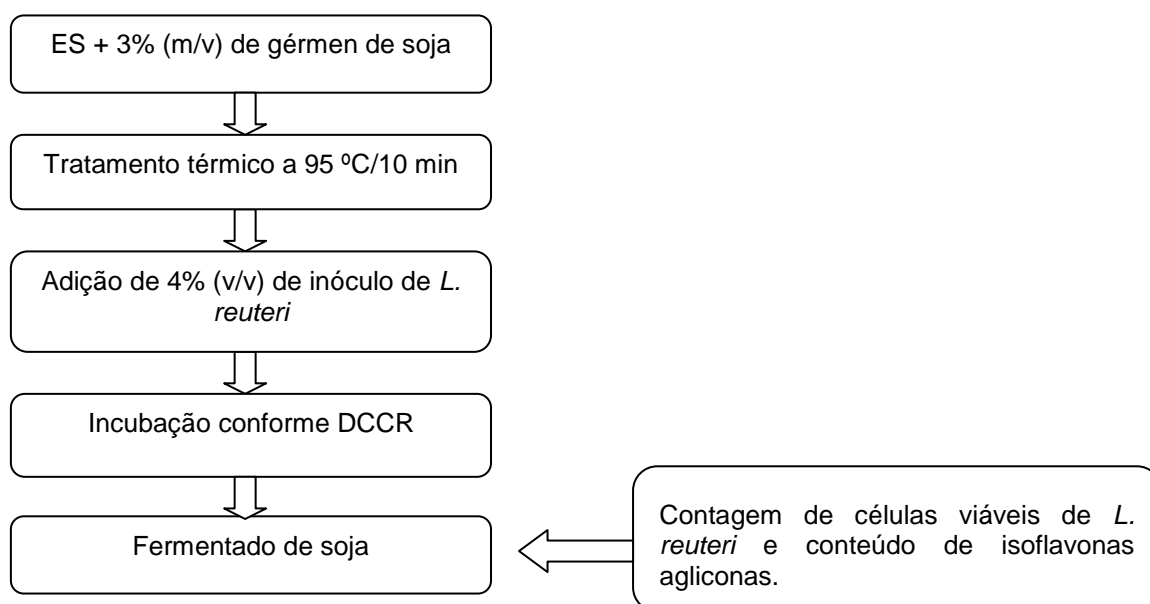


Figura 6 - Obtenção do produto fermentado de soja

4.2.5 Formulação da Bebida

As melhores condições observadas no DCCR, para a variável resposta contagem de células viáveis, foram utilizadas na elaboração da bebida. O fermentado sofreu adição de 12% (m/m) de sacarose comercial cristalizada, conforme trabalho realizado por Moraes Filho et al. (2014), sendo posteriormente homogeneizado e armazenado a 4 °C por 30 dias (Figura 7).

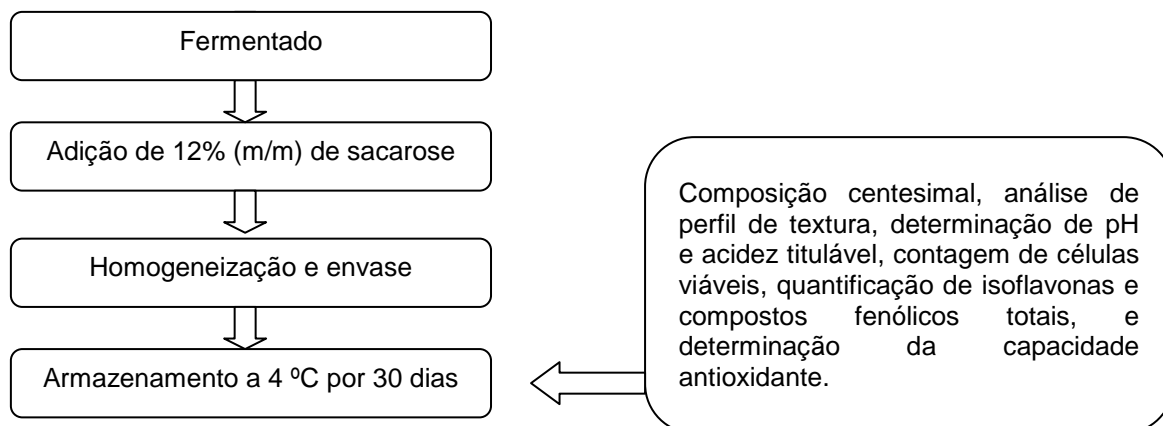


Figura 7 - Formulação da bebida fermentada

A composição centesimal e o perfil de textura foram avaliados após 12 h de armazenamento a 4 °C. Durante o período de estocagem, no 1^o, 15^o e 30^o dia, as amostras foram analisadas, em triplicata, quanto ao pH, acidez titulável, contagem de células viáveis, conteúdo e perfil de isoflavonas, conteúdo de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por sequestro de radicais DPPH[·] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS^{·+} [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].

4.2.6 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados, em triplicata, com potenciômetro digital (Hanna HI 223), previamente calibrado com soluções-tampões comerciais de pH 4, 7 e 10, conforme o método 017/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.2.7 Determinação da Acidez Titulável

A acidez titulável (AT) foi determinada, em triplicata, por titulação das amostras com NaOH 0,1 M, conforme o método 016/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os resultados foram expressos em g de ácido lático.100 g⁻¹ de produto.

4.2.8 Contagem de *Lactobacillus reuteri*

A contagem de *Lactobacillus reuteri* foi realizada em Ágar de Man, Rogosa e Sharp – MRS, conforme método descrito pela *American Public Health Association* – APHA (1992). Diluições seriadas das amostras foram semeadas, em triplicata, no ágar MRS pela técnica em profundidade (*pour-plate*). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose, contendo sistema de geração de atmosfera anaeróbia, a 37 °C por 48 h. As colônias visíveis foram contadas e os resultados foram expressos em log UFC.g⁻¹ de produto.

4.2.9 Avaliação da Composição Centesimal

A avaliação da composição centesimal das amostras foi realizada conforme as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e *Association of Official Agricultural Chemists* – AOAC (1995).

Foram determinados proteínas totais pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995), extrato etéreo com hidrólise ácida prévia e extração direta em Soxhlet (032/IV Adolfo Lutz, 2008), teor de umidade por secagem direta em estufa a 105 °C (012/IV Adolfo Lutz, 2008) e teor de cinzas por incineração a 550 °C (018/IV Adolfo Lutz, 2008). O conteúdo de carboidratos totais foi obtido por diferença dos demais constituintes.

4.2.10 Determinação e Quantificação do Perfil de Isoflavonas por CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra eficiência)

Os extratos para análise de isoflavonas foram obtidos conforme metodologia descrita por Yoshiara et al. (2012) e Handa et al. (2014). As amostras previamente liofilizadas (Christ Alpha 2-4 LD plus, Osterodeam Harz, Alemanha) foram submetidas à extração de lipídios com hexano (amostra:solvente, 1:10, m/v) sob agitação a 200 rpm, a 25 °C por 60 min, e posteriormente filtradas a vácuo. A extração de isoflavonas foi realizada em triplicata, na qual 0,3 g das amostras desengorduradas foram misturados com 6,0 mL de solvente extrator (água pura, etanol e acetona, 1:1:1, v/v/v), agitados

a 25 °C a cada 15 min durante 1 h, e levados para banho ultrassônico a 25 °C por 15 min (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003). As amostras foram centrifugadas a 2500 g, a 4 °C por 15 min, e os sobrenadantes coletados e filtrados (Millex – H de 0,22 µm) antes de serem submetidos à análise.

Os ensaios foram realizados de acordo com o método descrito por Handa et al. (2014). A separação e a quantificação de isoflavonas foram conduzidas em cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Acquity UPLC® System, Waters, Estados Unidos), utilizando coluna de fase reversa (modelo Acquity – UPLC BEH C18, Waters, Estados Unidos) com dimensões de 2,1 mm x 50 mm e partículas de 1,7 µm, e injetor automático de amostras. Para a eluição foi utilizado um sistema de gradiente binário, com fase móvel A contendo água pura acidificada a pH 3,0 com ácido acético glacial, e fase móvel B contendo acetonitrila. A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL.min⁻¹ e a temperatura da corrida foi mantida constante a 35 °C. Para a detecção foi utilizado o detector de arranjo de diodos (Waters) ajustado ao comprimento de onda de 260 nm.

A identificação das isoflavonas foi realizada por comparação com as curvas de calibração, utilizando os padrões de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), malonil-daidzina, malonil-glicitina, malonil-genistina, acetil-daidzina, acetil-glicitina, acetil-genistina (Wako Pure Chemical Industries, Japan). As curvas dos padrões foram utilizadas como referência para a quantificação das isoflavonas por padronização externa, e os resultados foram expressos em mg.g⁻¹ de amostra desengordurada e liofilizada (b.s.d).

4.2.11 Determinação de Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos foram extraídos de acordo com o método descrito por Hung et al. (2009), no qual 1,0 g das amostras previamente liofilizadas foi misturado com etanol 80% (1:10, m/v) e mantido sob agitação a 200 rpm, a 25 °C por 20 min. As amostras foram centrifugadas a 2200 g, a 4 °C por 10 min, e os sobrenadantes coletados. Os resíduos foram submetidos à extração por mais duas vezes, nas mesmas condições. Os extratos foram

concentrados em evaporador rotativo (MARCONI MA 120, São Paulo, Brasil) a 50 °C, até atingirem um volume final de 10 mL, e armazenados a -20 °C até o momento da análise.

A determinação dos fenólicos totais foi realizada conforme o método de Folin-Ciocalteu descrito por Swain e Hills (1959). Para a reação colorimétrica, 0,5 mL do extrato foi misturado com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10%, e incubado a 50 °C por 5 min. Após o tempo, foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (Libra S22, Biochrom[®], Reino Unido) com comprimento de onda a 760 nm. Para a quantificação dos compostos fenólicos, foi utilizada a curva de calibração com o padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha), e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra em base seca (mg EAG.100 g⁻¹).

4.2.12 Determinação da Capacidade Antioxidante: Sequestro de Radicais DPPH[·]

A capacidade antioxidante foi determinada por redução do radical DPPH[·] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos compostos oxidantes presentes na amostra, de acordo com o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Um volume de 50 µL do extrato (item 4.2.11) foi misturado com 1,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,5), 1,0 mL de etanol absoluto e 0,5 mL de solução de DPPH[·] 250 µM.L⁻¹. A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em ambiente escuro por 30 min. Após a reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Libra S22, Biochrom[®], Reino Unido) a 517nm.

Para a quantificação da capacidade antioxidante foi utilizada a curva de calibração com o padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich, Alemanha), e os resultados foram expressos em µmol equivalentes de Trolox por g de amostra em base seca (µmol ETrolox.g⁻¹).

4.2.13 Determinação da Capacidade Antioxidante: Sequestro de Radicais ABTS⁺

A capacidade antioxidante foi determinada por sequestro do radical cátion ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], conforme método descrito por Sanches-Gonzales, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005). Para o preparo do radical cátion, 5,0 mL de solução ABTS 7 mM foi misturada com 88 µL de persulfato de potássio 2,45 mM, e deixada reagir em ambiente escuro por 16 h. Após o tempo, a solução de ABTS⁺ foi diluída com etanol absoluto até apresentar absorvância entre 700-734 nm.

Para as análises, 30 µL do extrato (item 4.2.11) foram misturados com 3,0 mL da solução diluída de ABTS⁺. Após 6 min de reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Libra S22, Biochrom®, Reino Unido) a 734 nm.

Para a quantificação da atividade antioxidante foi utilizada a curva de calibração com o padrão de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemanha), e os resultados foram expressos em µmol equivalentes de Trolox por g de amostra em base seca (µmol ETrolox.g⁻¹).

4.2.14 Análise de Perfil de Textura

O teste de perfil de textura foi realizado em analisador de textura TA.XT2 (Stable Micro Systems Ltd, Godalming, Inglaterra). Uma ponta de prova (A/Be/35 mm) foi utilizada para medir, em triplicata, a textura das amostras à temperatura ambiente. A distância percorrida pela ponta de prova nas amostras foi até 30 mm, com velocidade de 1,0 mm/s e força aplicada de 0,09 N. Os resultados foram obtidos pelo programa Exponent Stable Micro Systems 6 (Stable Micro Systems, 2013).

4.2.15 Análise das Condições Higiênico-Sanitárias

A análise microbiológica da bebida fermentada com cultura probiótica foi realizada conforme o padrão microbiológico sanitário exigido pela Resolução –

RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, para produtos à base de soja – bebida à base de extrato de soja (BRASIL, 2001).

Foram realizadas as contagens de coliformes a 45 °C (*E. coli*), de *Salmonella* sp e *Bacillus cereus*, conforme os métodos descritos para exames microbiológicos em alimentos (*American Public Health Association – APHA*, 1992).

4.2.16 Análise Sensorial

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (CEP-UEL), conforme parecer nº 117.629, de 08/10/2012 (Anexo A).

Os participantes da avaliação sensorial da bebida à base de extrato e gérmen de soja fermentada com cultura probiótica assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B), no qual constavam a descrição dos objetivos da pesquisa bem como os eventuais riscos e benefícios, e responderam ao questionário sobre coleta de dados do provador (Anexo C).

As análises sensoriais foram aplicadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UEL. A avaliação sensorial da bebida foi realizada em cabines individuais, sob a luz branca. As amostras foram servidas em copos plásticos de cor branca, codificados com 3 dígitos aleatórios, em quantidades padronizadas (30 mL) e refrigeradas a 4 °C. As amostras estavam de acordo com o critério higiênico-sanitário exigido pela legislação vigente (BRASIL, 2001). A cultura probiótica utilizada era composta por linhagem comercial, de padrão alimentício.

A análise sensorial foi realizada pelo teste triangular, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (155/IV, 2008). As amostras eram constituídas de extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja ou de extrato fermentado sem gérmen de soja. No teste, foram ordenadas aleatoriamente três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. As amostras foram apresentadas simultaneamente e coube ao julgador identificar a amostra diferente, utilizando a ficha de avaliação (Anexo D). A probabilidade de acertos era de $p = 1/3$, e o resultado foi considerado

significativo ao nível de 5%. O teste contou com uma equipe não treinada de 35 julgadores.

O teste de aceitação por escala hedônica foi realizada conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (165/IV, 2008). No teste foi avaliada a formulação final da bebida fermentada, com a participação de uma equipe não treinada de 75 julgadores, que receberam a amostra codificada e avaliaram a intensidade dos atributos de cor, sabor, aroma, textura e aceitação global, utilizando uma escala estruturada de nove pontos, conforme a ficha de avaliação (Anexo E).

Por ser um produto probiótico, benefícios associados ao consumo, como menor tempo de trânsito intestinal, poderiam eventualmente ocorrer. Por outro lado, poderiam ocorrer alguns desconfortos abdominais, mesmo que raramente, como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, com cessão algumas horas após o consumo do produto.

4.2.17 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média \pm desvio padrão. O teste de Tukey foi empregado para comparação das médias, ao nível de 5% de significância. Os dados foram conduzidos pelo programa Statistica 8.0 (StatSoft[®] Inc, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição Centesimal do Grão e do Gérmen de Soja

Os grãos de soja da cultivar BRS 257 (Tabela 3), utilizados no presente trabalho, apresentaram teores de proteínas, lipídios, carboidratos, cinzas e umidade próximos aos valores encontrados na literatura para soja livre de lipoxigenases. No trabalho conduzido por Esteves et al. (2010), a composição centesimal da soja da cultivar UFV-116 (livre de LOX2 e LOX3) foi de 39,37% de proteínas, 20,83% de lipídios, 25,09% de carboidratos, 6,62% de cinzas e 8,09% de umidade. Já Ciabotti et al. (2006) relataram, para a soja da cultivar BRS 213, valores inferiores de proteínas (33,29%) e lipídios (15,30%). Para a soja convencional, Yu et al. (2013) descreveram teores de 38,61% de proteínas, 20,37% de lipídios, 6,06% de cinzas e 10,91% de umidade.

Tabela 3 - Composição centesimal dos grãos de soja BRS 257 e do gérmen de soja (Isosoy[®])

	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	Cinzas	Umidade
Grãos de soja	37,77 ^b ± 0,05	21,88 ^a ± 0,52	26,99 ^a ± 0,50	4,73 ^a ± 0,03	8,63 ^a ± 0,02
Gérmen de soja	41,10 ^a ± 0,13	18,73 ^b ± 0,10	29,26 ^a ± 0,13	3,59 ^b ± 0,03	7,32 ^b ± 0,02

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

O gérmen de soja (Isosoy[®]) apresentou valores peculiares de composição centesimal (Tabela 3). Hsu et al. (2007) analisaram um suplemento à base de gérmen de soja e encontraram 38,4% de proteínas, 9,2% de lipídios, 43,3% de carboidratos, 4,2% de cinzas e 4,9% de umidade, enquanto Tsangalis et al. (2004) realizaram pesquisas com gérmen de soja comercial contendo 40% proteínas e 25% carboidratos. A composição química de produtos à base de gérmen de soja difere conforme as marcas avaliadas, devido às variações na origem e no tipo de matéria-prima, estando sujeitos à mistura de outras frações do grão diferentes do hipocótilo. Segundo Yu et al. (2013), o hipocótilo de soja é constituído de 38,19% de proteínas, 10,98% de lipídios, 4,58% de cinzas e 8,91% de umidade.

5.2 Quantificação das Isoflavonas do Grão e do Gérmen de Soja

Por serem constituintes químicos da soja com propriedades funcionais distintas, as isoflavonas foram identificadas e quantificadas em isoflavonas totais e em frações malonil-glicosídicas, β -glicosídicas e agliconas.

O valor de isoflavonas totais para o grão de soja da cultivar BRS 257 foi de $5,34 \text{ mg.g}^{-1}$, em base seca desengordurada (b.s.d) (Tabela 4), composto por 77,90% malonil-glicosídeos, 19,85% β -glicosídeos e 2,25% agliconas. Segundo Tsukamoto et al. (1995), Liu (1997) e Lozovaya et al. (2005) a concentração de isoflavonas totais do grão de soja pode variar entre 0,1 a $5,0 \text{ mg.g}^{-1}$, dependendo do genótipo e das condições ambientais enfrentadas durante a maturação da semente. Paucar-Menacho et al. (2010) e Ho et al. (2002) encontraram, respectivamente, $3,90 \text{ mg.g}^{-1}$ e $3,45 \text{ mg.g}^{-1}$ de isoflavonas totais no grão de soja, compostas por malonil-glicosídeos (70,36% e 73,62%), β -glicosídeos (22,82% e 24,93%) e agliconas (6,74% e 1,16%). Yuan et al. (2009) e Góes-Favoni, Carrão-Panizzi e Beléia (2010) citam, em trabalhos anteriores, a existência de uma variação de 57-79% na concentração de malonil-glicosídeos e de 1-3% na concentração de agliconas no grão da soja.

Foram analisadas as isoflavonas presentes no cotilédone e no hipocótilo do grão de soja da cultivar BRS 257 (Tabela 4). Observa-se que o cotilédone apresentou um teor de isoflavonas totais 22% menor que o do grão inteiro, devido à remoção do hipocótilo. Segundo Tsukamoto et al. (1995) 10-20% do total de isoflavonas do grão estão concentrados no hipocótilo, o mesmo verificado por Góes-Favoni, Carrão-Panizzi e Beléia (2010) quando analisaram o cotilédone e o grão de soja da cultivar BRS 213, em que o primeiro apresentou 17% menos isoflavonas totais que o segundo. Neste trabalho, o perfil de isoflavonas do cotilédone foi de 76,63% malonil-glicosídeos, 22,17% β -glicosídeos e 1,20% agliconas, próximos aos valores encontrados para o grão inteiro.

Tabela 4 - Valores médios* de isoflavonas do grão de soja cultivar BRS 257, das frações do grão (hipocótilo e cotilédone) e do gérmen de soja (Isosoy®)

	Malonil-glicosídeos			B-glicosídeos			Agliconas			Isoflavonas Totais
	Mdai	Mgli	Mgen	Dai	Gli	Gen	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	
Grãos de soja	1,53 ^c ± 0,01	0,45 ^c ± 0,01	2,18 ^c ± 0,01	0,49 ^c ± 0,01	nd	0,57 ^c ± 0,01	0,07 ^b ± 0,01	nd	0,05 ^b ± 0,01	5,34 ^c ± 0,01
Cotilédone de soja	1,09 ^d ± 0,01	nd	2,09 ^d ± 0,01	0,37 ^c ± 0,01	nd	0,55 ^c ± 0,01	nd	nd	0,05 ^b ± 0,01	4,15 ^d ± 0,01
Hipocótilo de soja	9,97 ^b ± 0,01	1,73 ^b ± 0,01	3,63 ^a ± 0,01	3,07 ^b ± 0,01	3,29 ^b ± 0,01	0,99 ^b ± 0,01	nd	1,04 ^b ± 0,01	0,07 ^{a,b} ± 0,01	23,80 ^b ± 0,01
Gérmen de soja	11,79 ^a ± 0,05	4,06 ^a ± 0,01	2,53 ^b ± 0,01	9,33 ^a ± 0,06	4,00 ^a ± 0,01	1,81 ^a ± 0,01	0,51 ^a ± 0,01	1,91 ^a ± 0,01	0,11 ^a ± 0,01	36,05 ^a ± 0,04

* Médias de 3 determinações, expressos em mg.g⁻¹ em base seca desengordurada.

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Mdai: malonil-daidzina; Mgli: malonil-glicitina; Mgen: malonil-genistina; Dai: daidzina; Gli: glicitina; Gen: genistina.

nd: não detectado.

Em relação ao hipocótilo (Tabela 4), o teor de isoflavonas totais foi 5,73 vezes maior que do cotilédone. De acordo com Hubert et al. (2008) o hipocótilo, que representa 2% do peso total do grão, concentra naturalmente 6-10 vezes mais isoflavonas totais que o cotilédone. Yuan et al. (2009) encontraram no hipocótilo um conteúdo 7,8 vezes maior de isoflavonas que no cotilédone, distribuídos em malonil-glicosídeos (69,10%), β -glicosídeos (27,10%) e agliconas (3,80%), próximos aos valores encontrados no presente trabalho (64,41%, 30,88% e 4,66%, respectivamente).

Dentre as amostras avaliadas, o gérmen de soja (Isosoy[®]) apresentou o maior conteúdo de isoflavonas totais (36,05 mg.g⁻¹) (Tabela 4), sendo 50,98% malonil-glicosídeos, 41,99% β -glicosídeos e 7,02% agliconas. Hubert et al. (2008), ao analisarem amostras de produtos à base de gérmen de soja, encontraram um perfil de isoflavonas semelhante, constituído de malonil-glicosídeos (44,5%), β -glicosídeos (46,9%) e agliconas (7,3%).

Observa-se que houve diferença ($p \leq 0,05$) entre o conteúdo de isoflavonas (totais e frações) do hipocótilo e do gérmen de soja (Isosoy[®]). Os teores de β -glicosídeos e de agliconas no gérmen de soja foram 2 vezes maiores que os teores do hipocótilo, indicando que a origem da matéria-prima, a mistura de outras frações do grão ou o processamento utilizado na fabricação do produto possa ter acarretado essa diferença.

As agliconas do gérmen de soja (Isosoy[®]) foram compostas por 75,49% gliciteína, 20,16% daidzeína e 4,35% genisteína (Tabela 4). Tsangalis et al. (2004) observaram que o teor de gliciteína no gérmen de soja analisado era maior que das demais agliconas. De acordo com Yuan et al. (2009) a gliciteína e seus conjugados estão presentes quase exclusivamente nos tecidos do hipocótilo. Neste trabalho não foi detectada a presença de gliciteína no grão e no cotilédone, sendo identificada apenas no hipocótilo e no gérmen de soja.

O consumo de gérmen de soja visa à ação das isoflavonas como coadjuvante terapêutico na redução dos sintomas indesejáveis da menopausa, e na diminuição do risco de desenvolvimento de cânceres e de outras doenças crônicas. Segundo a pesquisa realizada por Arai et al. (2000), o consumo médio de isoflavonas totais das 115 mulheres japonesas entrevistadas era de 47 mg por dia, variando entre 12 a 118 mg de isoflavonas por dia. Taku et al.

(2007) verificaram que a ingestão diária de 102 mg de isoflavonas, por um período de 1-3 meses, pode reduzir o colesterol total e o colesterol LDL em indivíduos hipercolesterolêmicos.

Assim, com base na literatura e nos dados das análises, foi calculada a quantidade de gérmen de soja ideal para 100 mL de extrato de soja. Cada 1 grama de gérmen de soja concentra cerca de 33,41 mg de isoflavonas totais e 2,34 mg de agliconas (base úmida). A adição de 3 g de gérmen, sem considerar o conteúdo de isoflavonas do extrato de soja, resultaria em um produto contendo cerca de 100,23 mg de isoflavonas totais, teor que pode conferir os efeitos benéficos das isoflavonas ao organismo, conforme relatados na literatura.

5.3 Planejamento Experimental

Na Tabela 5, observam-se os efeitos das variáveis temperatura e tempo sobre as variáveis respostas contagem de células viáveis ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) e teor de isoflavonas agliconas (mg.g^{-1}), em extrato de soja contendo 3% (m/v) de gérmen de soja e 4% (v/v) de *L. reuteri*.

Nas mesmas condições experimentais, para cada um 14 dos ensaios, foram retiradas amostras para determinação das variáveis respostas. A contagem inicial de células viáveis no extrato era de $5,81 \pm 0,09 \log \text{UFC.g}^{-1}$, e no DCCR as contagens variaram de $8,24 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (32 °C/16 h) a $9,52 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (36 °C/24h). Para as isoflavonas agliconas, o conteúdo inicial no extrato era de $2,50 \text{mg.g}^{-1}$, e no DCCR variou de $2,99 \text{mg.g}^{-1}$ (41,5 °C/24h) a $10,75 \text{mg.g}^{-1}$ (36 °C/35,3 h).

Dos resultados experimentais para a variável resposta contagem de células viáveis de *L. reuteri* (Tabela 6), foram considerados significativos os parâmetros com p – valores menores que 5%. Os termos lineares (L) da temperatura, do tempo e da interação entre temperatura e tempo não foram significativos ($p \geq 0,05$). Observa-se que os efeitos dos termos quadráticos (Q) das variáveis temperatura e tempo foram negativos e significativos ($p \leq 0,05$), indicando que, no intervalo dos níveis estudados, ambas as variáveis apresentaram uma região de máxima resposta com a curvatura da superfície de resposta voltada para baixo.

Tabela 5 – Matriz do DCCR 2² e funções-respostas: y_1 (contagem de células viáveis) e y_2 (teor de isoflavonas agliconas)

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Células viáveis* log UFC.g ⁻¹	Agliconas* (mg.g ⁻¹)
1	32	16	8,24	9,36
2	40	16	8,75	5,24
3	32	32	8,79	5,73
4	40	32	8,35	8,52
5	36	24	9,23	9,58
6	36	24	9,07	9,55
7	36	24	9,49	9,39
8	30	24	9,23	8,82
9	41,5	24	8,28	2,99
10	36	12,7	8,56	8,28
11	36	35,3	9,37	10,75
12	36	24	9,52	8,60
13	36	24	9,46	8,19
14	36	24	9,24	8,70

*Média de 3 determinações; Agliconas: daidzeína, gliciteína e genisteína.

Tabela 6 - Efeitos estimados e coeficientes de regressão para a variável resposta contagem de células viáveis de *L. reuteri*

	Efeito estimado	Erro padrão	p – valor	Coefficiente de regressão
Principal	9,3350	0,1130	0,0000*	9,3350
Bloco	0,2486	0,1479	0,0635	0,1243
Temperatura (L)	-0,3184	0,1957	0,0692	-0,1592
Temperatura (Q)	-0,7437	0,2037	0,0052*	-0,3719
Tempo (L)	0,3239	0,1957	0,0661	0,1619
Tempo (Q)	-0,5337	0,2037	0,0165*	-0,2669
Temperatura (L) x Tempo (L)	-0,4750	0,2767	0,0599	-0,2375

Termos lineares (L) e termos quadráticos (Q); * significativo ($p \leq 0,05$).

Considerando apenas as variáveis significativas, foi proposto um modelo, com as variáveis codificadas, que representa a contagem de células viáveis de *L. reuteri* (y_1) (log UFC.g⁻¹) em função da temperatura (x_1) e do tempo (x_2) na faixa estudada:

$$y_1 = 9,3350 - 0,1592 x_1 - 0,3719 x_1^2 + 0,1619 x_2 - 0,2669 x_2^2 - 0,2375 x_1 x_2$$

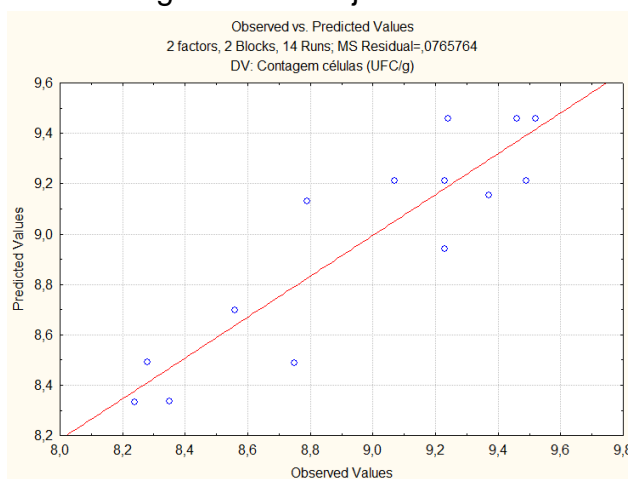
A equação foi validada pelo teste F (Tabela 7). O valor de F calculado para a regressão (15,49) foi maior que o valor de F tabelado (3,71) ao nível de 5% de significância. O coeficiente de determinação R², maior que 80%, indica que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais e pode ser utilizado para fins preditivos. Na Figura 8 observa-se que os valores experimentais e os valores preditos da contagem de *L. reuteri* foram próximos, indicando um bom ajuste do modelo.

Tabela 7 - ANOVA para contagem de células viáveis de *L. reuteri*

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F _{cal}	F _{tab}	R ²
Regressão	1,5471	3	0,5157	15,49*	3,71	0,8108
Resíduo	1,2863	10	0,1286			
Falta de Ajuste	1,1530	6	0,1922	5,77	6,16	
Erro Puro	0,1333	4	0,0333			
Total	2,8334	13				

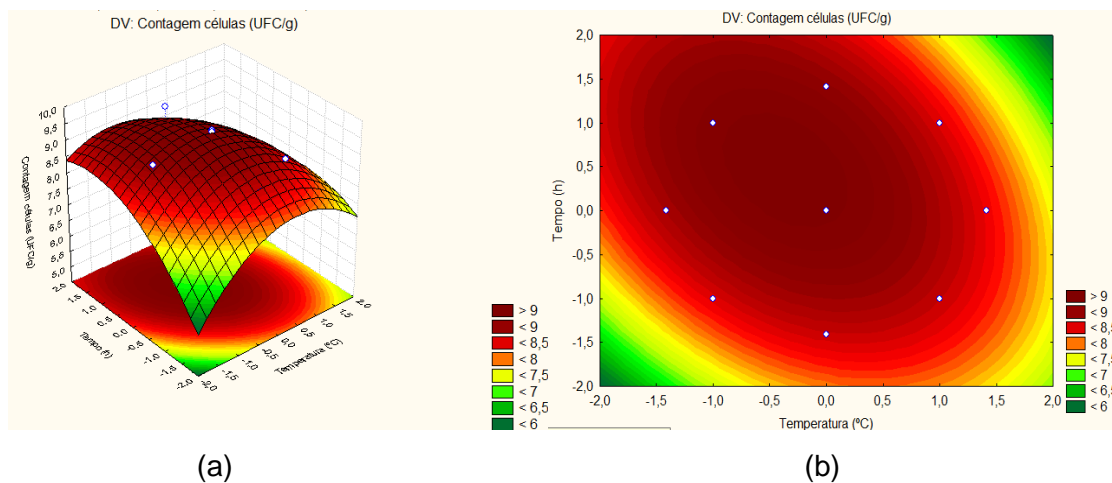
R²: coeficiente de determinação; * significativo ($p \leq 0,05$).

Figura 8 - Valores observados e valores preditos para contagem de *L. reuteri* em extrato fermentado com germen de soja



O modelo empírico foi plotado em uma superfície com 3 dimensões, representando a resposta (contagem de células viáveis de *L. reuteri*) como uma função de dois fatores (temperatura e tempo) (Figura 9a). As curvas de contorno ilustram a interação dos fatores sobre a resposta (Figura 9b). Observa-se o aumento da contagem de *L. reuteri* com a elevação da temperatura e do tempo, até atingir um ponto crítico (máxima resposta). As condições experimentais que resultaram em maior contagem de células foram 32-36 °C para a temperatura e 24-32 h para o tempo de incubação.

Figura 9 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da temperatura e do tempo para contagem de células viáveis de *L. reuteri*



Nas mesmas condições experimentais, para o teor de isoflavonas agliconas foram considerados significativos os parâmetros com p – valores menores que 5% (Tabela 8). Assim, os termos lineares (L) e quadráticos (Q) da variável tempo não tiveram significância estatística ($p \geq 0,05$). Analisando os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$), observa-se que o termo quadrático (Q) da variável temperatura apresentou efeito negativo, indicando existência de uma região de máxima resposta e uma superfície de resposta na forma de uma parábola com a curvatura voltada para baixo. A interação entre temperatura e tempo mostrou efeito positivo, isto é, a combinação entre os níveis altos ou entre os níveis baixos destes fatores resulta em maior teor de isoflavonas agliconas.

Tabela 8 - Efeitos estimados e coeficientes de regressão para a resposta teor de isoflavonas agliconas

	Efeito Estimado	Erro padrão	p – valor	Coefficiente de regressão
Principal	9,0031	0,4862	0,0000*	9,0031
Bloco	-0,1522	0,6366	0,8179	-0,0761
Temperatura (L)	-2,3961	0,8421	0,0249*	-1,1981
Temperatura (Q)	-3,3489	0,8765	0,0065*	-1,6745
Tempo (L)	0,7834	0,8421	0,3832	0,3917
Tempo (Q)	0,2657	0,8765	0,7706	0,1329
Temperatura (L) x Tempo (L)	3,4523	1,1910	0,0230*	1,7261

Termos lineares (L) e termos quadráticos (Q); * significativo ($p \leq 0,05$).

Considerando apenas as variáveis significativas, foi proposto o modelo, com as variáveis codificadas, que representa o teor de isoflavonas agliconas (y_2) (mg.g^{-1}) em função da temperatura (x_1) e do tempo (x_2) na faixa estudada:

$$y_2 = 9,0031 - 1,1981 x_1 - 1,6745 x_1^2 + 0,3917 x_2 + 0,1329 x_2^2 + 1,7261 x_1x_2$$

A equação foi validada pelo teste F (Tabela 9). O valor de F calculado para a regressão (348,39) foi maior que o valor de F tabelado (3,71), sendo portanto significativo ($p \leq 0,05$). O coeficiente de determinação R^2 (82,2%) indica que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Embora a falta de ajuste (45,72) tenha sido significativa ao nível de 5%, as médias das repetições nos pontos centrais foram próximas e o erro puro baixo. Nesse caso, de acordo com Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010), o modelo pode ser considerado válido para fins preditivos. Na Figura 10 observa-se os valores experimentais e os valores preditos dos teores de isoflavonas agliconas.

Através da superfície de resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo (Figura 11), foram observadas as condições que resultaram em maior conteúdo de isoflavonas agliconas. Verifica-se que a faixa de maior resposta foi de 28-34 °C (8-12 h) e de 36-42 °C (36-40h), que corresponde ao intervalo de maior atividade da enzima β -glicosidase.

Tabela 9 - ANOVA para teor de isoflavonas agliconas

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F cal	F tab	R ²
Regressão	44,1058	3	14,7019	348,39*	3,71	0,8222
Resíduo	11,7462	10	1,1746			
Falta de Ajuste	11,5775	6	1,9296	45,72*	6,16	
Erro Puro	0,1687	4	0,0422			
Total	55,8520	13				

R²: coeficiente de determinação; * significativo ($p \leq 0,05$).

Figura 10 - Valores observados e valores preditos para teor de isoflavonas agliconas em extrato fermentado com gérmen de soja

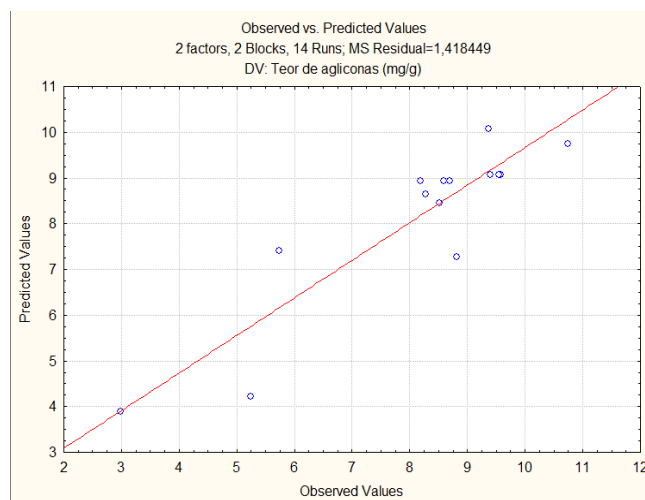
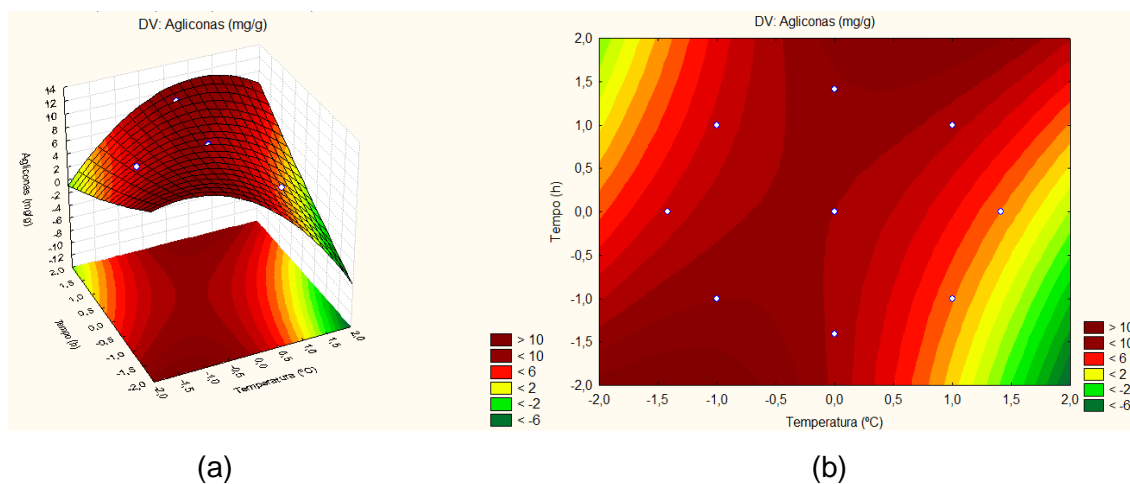


Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da temperatura e do tempo para teor de isoflavonas agliconas



Marazza et al. (2009) observaram aumento da β -glicosidase durante a fase exponencial de crescimento de *L. rhamnosus* CRL 981 em extrato de soja (3-12 h a 37 °C). O *L. reuteri* mostrou maior crescimento em temperaturas mais brandas (32-36 °C), sugerindo que o metabolismo seja maior nas mesmas condições.

Por outro lado, de acordo com Matsuura et al. (1995) a temperatura ótima da atividade de β -glicosidase endógena da soja é 45 °C e pH ótimo entre 4,5-5,5. O teor elevado de isoflavonas agliconas observado no intervalo de 36-42 °C, após 36-40h de incubação, mostra que as condições foram favoráveis para a atividade de β -glicosidase. Liu et al. (2013) obtiveram maior conversão de glicosídeos em isoflavonas agliconas através da hidrólise ácida.

Donkor e Shah (2008) observaram que o teor de isoflavonas agliconas era maior durante o máximo de crescimento das bactérias lácticas no extrato de soja. Neste trabalho observou-se que as condições experimentais de maior contagem de células de *L. reuteri* (32-36 °C e 24-32 h) não coincidiram com as condições de maior conteúdo de isoflavonas agliconas. No entanto, o intervalo ótimo para o crescimento de *L. reuteri* apresentou um teor de isoflavonas agliconas satisfatório, estabelecendo-se assim, para o presente trabalho, as condições de fermentação do extrato de soja: 36 °C e 24h.

5.4 Composição Centesimal de Extratos Fermentados e Não Fermentados

Os resultados médios da composição centesimal de extrato de soja (ES), extrato de soja fermentado (EF), extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja (EGF), e de extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja e adoçado com 12% (m/m) de sacarose (EGFA) são apresentados na Tabela 10.

O ES (Tabela 10) apresentou valores de composição centesimal similares aos descritos na literatura para extratos de soja livre de lipoxigenases. Ciabotti et al. (2006) analisaram o extrato de soja da cultivar BRS 213 e encontraram 3,26% de proteínas, 1,72% de lipídios, 0,36% de cinzas e 93,79% de umidade. Cabral (2009), para o extrato de soja da cultivar BRS 213, encontrou valores próximos de proteínas (3,35%), lipídios (1,85%), cinzas (0,29%) e umidade (93,71%). A composição do ES enquadra-se nos padrões

legais vigentes para o extrato de soja, que estabelecem os teores máximos de 93% de umidade e 0,6% de cinzas, e o teor mínimo de 3,0% de proteína. De acordo com Penonne (1989) são toleráveis variações de 10% nos valores da composição centesimal, devido à diversidade inerente aos grãos de soja.

Tabela 10 - Composição centesimal do ES, EF, EGF e EGFA

	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	Cinzas	Umidade
ES	3,29 ^c ± 0,01	1,85 ^a ± 0,08	1,40 ^b ± 0,08	0,39 ^b ± 0,01	93,07 ^b ± 0,02
EF	3,01 ^d ± 0,01	1,81 ^a ± 0,03	1,39 ^b ± 0,01	0,37 ^b ± 0,01	93,42 ^a ± 0,02
EGF	4,56 ^a ± 0,03	2,07 ^a ± 0,18	1,98 ^b ± 0,20	0,51 ^a ± 0,01	90,87 ^c ± 0,04
EGFA	3,81 ^b ± 0,02	1,95 ^a ± 0,02	12,60 ^a ± 0,04	0,42 ^b ± 0,01	81,21 ^d ± 0,01

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

ES: extrato de soja; EF: extrato de soja fermentado; EGF: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja; EGFA: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja e adoçado com 12% (m/m) de sacarose.

Após a fermentação do ES com *L. reuteri* a 36 °C por 24 h, o EF e o EGF (Tabela 10) apresentaram valores próximos de lipídios e de carboidratos na composição centesimal. O gérmen de soja adicionado ao extrato (EGF) incrementou os teores de proteínas e cinzas em, respectivamente, 51,5% e 37,8%, e reduziu o teor de umidade em 2,7%, quando comparado com EF.

Por sua vez, a adição de 12% (m/m) de sacarose ao EGF resultou em decréscimo dos teores de proteínas, lipídios, cinzas e umidade (Tabela 10), e acréscimo do teor de carboidratos. Conforme o trabalho realizado por Cabral (2009), a composição do extrato fermentado de soja (BRS 213) adoçado com 8% de glicose foi 3,47% de proteínas, 1,98% de lipídios, 0,20% de cinzas e 86,18% de umidade.

5.5 Quantificação das Isoflavonas de Extratos Fermentados e Não Fermentados

O conteúdo de isoflavonas totais para ES (Tabela 11) foi de 4,60 mg.g⁻¹ (b.s.d). Toro-Funes et al. (2012) analisaram seis amostras comerciais de extratos de soja, e verificaram que os teores de isoflavonas totais variavam de 1,81 mg.g⁻¹ a 3,19 mg.g⁻¹ (b.s), variações decorrentes da matéria-prima ou do método utilizado para a obtenção do extrato.

Tabela 11 - Valores médios* de isoflavonas do extrato de soja (ES), do extrato de soja fermentado (EF), do extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja (EGF) e do EGF com adição de 12% (m/m) de sacarose (EGFA), ao 1º, 15º e 30º dia de armazenamento a 4 °C

	Malonil-glicosídeos			B-glicosídeos			Agliconas			Isoflavonas Totais
	Mdai	Mgli	Mgen	Dai	Gli	Gen	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	
ES	1,09 ^h ± 0,00	0,25 ^g ± 0,00	1,48 ^f ± 0,00	0,75 ^a ± 0,00	nd	0,90 ^a ± 0,00	0,08 ^g ± 0,00	nd	0,05 ^g ± 0,01	4,60 ^f ± 0,00
EF 01	1,51 ^d ± 0,00	0,37 ^d ± 0,01	2,24 ^{b,c} ± 0,00	nd	nd	nd	0,48 ^f ± 0,00	0,81 ⁱ ± 0,02	0,47 ^d ± 0,00	5,88 ^c ± 0,01
EF 15	1,40 ^{e,f} ± 0,00	0,36 ^d ± 0,00	2,06 ^d ± 0,00	nd	nd	nd	0,57 ^e ± 0,00	1,00 ^h ± 0,00	0,56 ^b ± 0,00	5,95 ^c ± 0,00
EF 30	1,32 ^g ± 0,00	0,33 ^f ± 0,00	1,94 ^e ± 0,01	nd	nd	nd	0,59 ^e ± 0,00	1,08 ^g ± 0,00	0,59 ^a ± 0,00	5,86 ^c ± 0,02
EGF 01	4,18 ^a ± 0,02	1,66 ^a ± 0,00	2,41 ^a ± 0,01	nd	0,64 ^a ± 0,00	nd	2,19 ^b ± 0,01	4,14 ^c ± 0,01	0,53 ^c ± 0,00	15,74 ^a ± 0,05
EGF 15	4,01 ^b ± 0,03	1,61 ^b ± 0,01	2,31 ^b ± 0,01	nd	0,54 ^b ± 0,00	nd	2,23 ^a ± 0,01	4,31 ^b ± 0,03	0,56 ^b ± 0,00	15,57 ^a ± 0,10
EGF 30	3,73 ^c ± 0,00	1,50 ^c ± 0,00	2,16 ^c ± 0,00	nd	0,39 ^c ± 0,00	nd	2,21 ^{a,b} ± 0,00	4,80 ^a ± 0,01	0,56 ^b ± 0,00	15,35 ^b ± 0,02
EGFA 01	1,41 ^e ± 0,00	0,49 ^d ± 0,00	0,73 ^g ± 0,00	0,33 ^b ± 0,00	nd	nd	0,78 ^d ± 0,00	1,27 ^f ± 0,00	0,21 ^f ± 0,00	5,22 ^e ± 0,01
EGFA 15	1,39 ^{e,f} ± 0,01	0,49 ^d ± 0,01	0,71 ^{g,h} ± 0,00	0,32 ^b ± 0,00	nd	nd	0,80 ^d ± 0,00	1,43 ^e ± 0,00	0,22 ^f ± 0,00	5,35 ^{d,e} ± 0,03
EGFA 30	1,34 ^{f,g} ± 0,01	0,47 ^d ± 0,00	0,63 ^h ± 0,00	0,25 ^c ± 0,00	nd	nd	0,84 ^c ± 0,00	1,73 ^d ± 0,00	0,25 ^e ± 0,00	5,51 ^d ± 0,01

* Médias de 3 determinações, expressos em mg.g⁻¹ em base seca desengordurada.

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Mdai: malonil-daidzina; Mgli: malonil-glicitina; Mgen: malonil-genistina; Dai: daidzina; Gli: glicitina; Gen: genistina.

ES: extrato de soja; EF: extrato de soja fermentado; EGF: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja; EGFA: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja e adoçado com 12% (m/m) de sacarose.

nd: não detectado.

Com base nos dados obtidos, foi constatado que 100 mL de ES contêm aproximadamente 37,70 mg de isoflavonas totais, sendo 2,83% (0,95 mg) isoflavonas agliconas. Rodriguez-Roque et al. (2013) relataram o valor de 48,9 mg de isoflavonas totais em 100 mL de extrato de soja, próximo ao valor encontrado no presente trabalho.

O EF (Tabela 11), após incubação com *L. reuteri* a 36 °C por 24 h, apresentou maior teor de isoflavonas quando comparado com ES ($p \leq 0,05$). Houve um acréscimo de 46,10% e 27,83% nos teores de malonil-glicosídeos e de isoflavonas totais no EF, respectivamente. Ding e Shah (2010) observaram aumento de 29,2% nos teores de malonil-glicosídeos em extrato de soja fermentado a 37 °C por 24 h com *L. salivarius* e *L. rhamnosus*.

Observa-se que o teor de isoflavonas agliconas do EF foi significativamente maior que do ES ($p \leq 0,05$) (Tabela 11). Wei et al. (2007) e Marazza et al. (2009) verificaram aumento significativo de isoflavonas agliconas após fermentação do extrato de soja por bactérias lácticas a 37 °C por 24 h. De acordo com Murphy, Barua e Hauck (2002), os alimentos fermentados apresentam maior conteúdo de agliconas devido à ação conjunta das enzimas β -glicosidases endógenas da soja e das sintetizadas pelos micro-organismos fermentadores.

Com base nos dados obtidos, foi calculado que 100 g de EF contêm cerca de 42,25 mg de isoflavonas totais, sendo 29,93% (12,65 mg) isoflavonas agliconas. Observa-se que os teores de isoflavonas totais de EF (Tabela 11) mantiveram-se estáveis a 4 °C por 30 dias. Otieno, Ashton e Shah (2007) observaram redução das isoflavonas totais durante o armazenamento (4 °C por 30 dias) do extrato de soja fermentado por *L. acidophilus*. Durante o período de estocagem (Tabela 11), houve decréscimo significativo ($p \leq 0,05$) dos teores de malonil-glicosídeos e acréscimo significativo ($p \leq 0,05$) dos teores de agliconas, tanto para as amostras de EF quanto para as amostras de EGF e EGFA.

O EGF apresentou o maior conteúdo de isoflavonas totais (15,74 mg.g⁻¹) dentre as amostras (Tabela 11). Além disso, foi detectada a presença da isoflavona glicitina no EGF, decorrente das altas concentrações de malonil-glicitina e de glicitina encontradas no gérmen de soja (Tabela 4). Após 30 dias de armazenamento do EGF, houve decréscimo de 39,06% no teor de glicitina e

acréscimo de 16% no teor de gliciteína, cujo valor foi quatro vezes superior ao do EF.

Para todas as amostras analisadas, o teor de gliciteína contribuiu para o conteúdo de isoflavonas agliconas. Conforme Song et al. (1998), Song, Hendrich e Murphy (1999) e Wiseman et al. (2002), com o potencial estrogênico relativo superior (gliciteína > genisteína > daidzeína), a gliciteína pode produzir um efeito estrogênico no organismo, principalmente após o consumo de produtos contendo gérmen de soja.

Quanto ao EGFA (Tabela 11), houve diminuição do teor de isoflavonas totais e frações quando comparado com EGF, decorrente da adição de 12% (m/m) de sacarose. No EGFA foi observada a presença da isoflavona daidzina e a redução de 60% no teor de genisteína, semelhante ao descrito por Wei et al. (2007), que notaram, no extrato de soja fermentado por *L. paracasei* e *L. acidophilus* com 10% de sacarose, aumento de 70% no teor de daidzina e diminuição de 59% no teor da genisteína, quando comparado com extrato de soja sem sacarose fermentado pelas mesmas cepas. A presença de daidzina no EGFA sugere que houve mudança na atividade enzimática de *L. reuteri*, que respondeu às alterações encontradas na composição do meio de crescimento.

Com base nos dados obtidos, foi calculado que cada 100 g de EGF e de EGFA contêm, respectivamente, cerca de 155,35 mg (67,66 mg de agliconas) e 100,35 mg (43,45 mg de agliconas) de isoflavonas totais. Considerando que 3 gramas de gérmen de soja possuem 100,23 mg de isoflavonas totais (7,02 mg de agliconas), e que 100 mL de extrato de soja contém 37,70 mg de isoflavonas totais (0,95 mg de agliconas), esperava-se um produto contendo cerca de 133,93 mg de isoflavonas totais com 7,97 mg de agliconas. No entanto, os teores de agliconas obtidos tanto no EGF quanto no EGFA foram superiores ao previsto, ressaltando os efeitos da adição do gérmen de soja e da fermentação no conteúdo de isoflavonas agliconas do produto.

5.6 Compostos Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante

O grão de soja da cultivar BRS 257 apresentou o conteúdo de compostos fenólicos de 104,01 mg EAG.100 g⁻¹ (base seca) (Tabela 12). Zhang et al. (2012) analisaram 13 amostras de diferentes tipos de soja e

encontraram teores de fenólicos que variavam entre 85-230 mg EAG.100g⁻¹, enquanto Slavin, Kenworthy e Yu (2009) determinaram teores de fenólicos entre 100-200 mg EAG.100 g⁻¹ para grãos de soja.

Tabela 12 - Valores médios* de compostos fenólicos e capacidade antioxidante por sequestro de DPPH[·] e ABTS⁺ para grão de soja BRS 257, gérmen de soja (Isosoy[®]), extratos fermentados adicionados ou não de gérmen de soja, ao 1^o, 15^o e 30^o dia de armazenamento a 4 °C

Amostra	Fenólicos (mg EAG.100g ⁻¹)	DPPH [·] (μmol ETrolox.g ⁻¹)	ABTS ⁺ (μmol ETrolox.g ⁻¹)
Grão de soja	104,01 ^j ± 0,07	3,06 ^b ± 0,03	1,04 ^f ± 0,00
Gérmen de soja	442,73 ^a ± 0,78	3,67 ^a ± 0,02	5,00 ^a ± 0,09
ES	146,56 ^g ± 0,08	2,06 ^e ± 0,06	2,52 ^d ± 0,01
EF 01	161,86 ^f ± 0,17	2,51 ^{c,d} ± 0,07	3,09 ^c ± 0,00
EF 15	171,11 ^e ± 0,62	2,95 ^b ± 0,04	3,12 ^c ± 0,02
EF 30	193,74 ^d ± 0,67	3,11 ^b ± 0,15	3,10 ^c ± 0,00
EGF 01	303,37 ^b ± 0,40	2,27 ^{d,e} ± 0,02	3,32 ^{b,c} ± 0,00
EGF 15	271,38 ^c ± 0,33	2,79 ^{b,c} ± 0,03	3,55 ^b ± 0,01
EGF 30	273,40 ^c ± 0,77	2,80 ^{b,c} ± 0,11	3,52 ^b ± 0,06
EGFA 01	122,38 ⁱ ± 0,35	1,97 ^e ± 0,03	1,68 ^e ± 0,02
EGFA 15	126,22 ^h ± 0,09	1,92 ^e ± 0,04	1,59 ^e ± 0,07
EGFA 30	146,22 ^g ± 0,32	2,10 ^e ± 0,02	1,65 ^e ± 0,07

* Médias de 3 determinações.

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

EAG: Equivalente de ácido gálico; ETrolox: Equivalente de Trolox.

ES: extrato de soja; EF: extrato de soja fermentado; EGF: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja; EGFA: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja e adoçado com 12% (m/m) de sacarose.

O teor de fenólicos no gérmen de soja foi quatro vezes superior (442,73 mg EAG.100 g⁻¹) ao do grão de soja da cultivar BRS 257, em virtude da maior concentração de isoflavonas no gérmen. Barbosa et al. (2006) encontraram no gérmen um teor de fenólicos duas vezes superior ao do grão de soja analisado. Já Bolanho e Beléia (2011) determinaram teores de fenólicos de 187,8 e 213,9 mg EAG.100 g⁻¹, respectivamente, para grãos de soja da cultivar BRS 267 e para o gérmen de soja analisado.

A capacidade antioxidante determinada por sequestro de radicais DPPH[·] foi 3,06 $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$ para o grão de soja e 3,67 $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$ para o gérmen de soja (Tabela 12). Bolanho e Beléia (2011) relataram valores de 4,0 e 3,4 $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$, respectivamente, para grãos de soja da cultivar BRS 267 e para o gérmen de soja, enquanto Barbosa et al. (2006) citaram valores respectivos de 3,7 e 5,1 $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$.

Em relação à capacidade antioxidante determinada por sequestro de radicais ABTS⁺, os valores encontrados foram 1,04 e 5,0 $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$, respectivamente, para o grão e para o gérmen de soja (Tabela 12). Ao analisarem 13 amostras de grãos de soja, Zhang et al. (2012) verificaram valores entre 2-4 $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$, e Bolanho e Beléia (2011) determinaram valores de 7,1 e 7,6 $\mu\text{mol ETrolox.g}^{-1}$ respectivos para o grão da cultivar BRS 267 e para o gérmen de soja.

As variações nos resultados das análises de capacidade antioxidante podem ser explicadas pelos teores de isoflavonas encontrados nos grãos e nos germens de soja, e pelas diferenças do genótipo e das condições de cultivo dos grãos. Segundo Zhang et al. (2012) os ensaios de atividade antioxidante envolvem mecanismos químicos diferentes, sem correlação significativa entre si.

O ES apresentou o teor de fenólicos de 146,56 mg EAG.100 g⁻¹ (Tabela 12). Em trabalhos de Xu e Chang (2009) e Tyug et al. (2010), foram relatados teores de fenólicos entre 96-320 mg EAG.100 g⁻¹ para o extrato de soja, variações decorrentes do tipo da soja utilizada e das condições de processamento do extrato.

Tanto EF quanto EGF apresentaram teores de fenólicos superiores ao ES (Tabela 12). Para o EF o valor foi 10,4% superior (161,86 mg EAG.100 g⁻¹). Lai et al. (2013) verificaram teores de fenólicos de, respectivamente, 113,3 e 126,1 mg.EAG.g⁻¹ para o extrato de soja não fermentado e para o extrato fermentado, um acréscimo de 11,3% de fenólicos após a fermentação do extrato por bactérias lácticas, semelhante ao encontrado no presente trabalho. Houve ainda aumento significativo ($p \leq 0,05$) do teor de fenólicos de EF após 30 dias de armazenamento a 4 °C (Tabela 12).

Para o EGF (Tabela 12) o teor de fenólicos foi duas vezes superior (303,37 mg EAG.100g⁻¹) ao ES, resultado da adição do gérmen de soja. Houve

redução significativa ($p \leq 0,05$) de fenólicos no EGF após 15 dias de armazenamento (Tabela 12), que acompanhou a diminuição das isoflavonas totais nas mesmas condições (Tabela 11). Já o EGFA apresentou teores de fenólicos inferiores ao ES.

Em relação à capacidade antioxidante determinada por sequestro de radicais DPPH \cdot , tanto EF quanto EGF apresentaram valores superiores ao de ES, com aumento significativo ($p \leq 0,05$) após 15 dias de estocagem (Tabela 12). Marazza et al. (2009) observaram aumento significativo da capacidade antioxidante do extrato de soja fermentado por *L. rhamnosus*, quando comparado com extrato de soja não fermentado. De acordo com Marazza et al. (2009) o conteúdo de isoflavonas agliconas formadas após a fermentação pode contribuir para a atividade antioxidante do extrato. A daidzeína e a genisteína podem atuar como doadoras de hidrogênio e sequestrar efetivamente o radical DPPH \cdot . O valor encontrado para EGFA foi inferior ao de ES, e manteve-se estável durante o armazenamento.

Quanto a capacidade antioxidante determinada por sequestro de radicais ABTS $^{+}$, os valores de EF e EGF foram superiores ao de ES, e estáveis ao longo dos 30 dias a 4 °C (Tabela 12). De acordo com Hubert et al. (2008) as isoflavonas agliconas são compostos anti-radicais mais ativos que seus precursores β -glicosídeos, acentuando a atividade antioxidante dos alimentos fermentados. Já a capacidade antioxidante do EGFA foi inferior à de ES e estável durante a estocagem. Os resultados da atividade antioxidante observados durante o armazenamento a 4 °C condizem com os valores de isoflavonas agliconas formadas nas mesmas condições (Tabela 11).

5.7 Contagem de Células Viáveis, pH e Acidez Titulável

Os extratos de soja, ao serem inoculados com *L. reuteri*, apresentaram contagens iniciais de células viáveis em torno de $5,81 \pm 0,09 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Após o processo fermentativo a 36 °C por 24 h, as contagens de lácticas no EF, EGF e EGFA atingiram valores de 7-8 $\log \text{UFC.g}^{-1}$ (Tabela 13). No EGF, o número de células viáveis foi maior que no EF e EGFA ($p \leq 0,05$) durante os primeiros 15 dias de armazenamento, indicando que houve influência positiva do gérmen de soja sobre o crescimento de *L. reuteri*.

Ao 30º dia de estocagem (Tabela 13), não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) das contagens de EF, EGF e EGFA em relação ao 1º dia, mostrando que a adição de 3% (m/v) de gérmen de soja ou de 12% (m/m) de sacarose não prejudicou a estabilidade e a viabilidade do *L. reuteri* em extrato de soja. As contagens permaneceram estáveis a 7-8 log UFC.g⁻¹ ao longo do período de armazenamento a 4 °C. Para que os micro-organismos sejam considerados probióticos e possam atuar *in vivo*, o alimento deve conter no mínimo 8-9 log UFC por porção do produto pronto para consumo (BRASIL, 2002; 2008), conforme foi obtido neste trabalho.

Tabela 13 - Valores de contagem de células viáveis de *L. reuteri*, pH e acidez titulável para extratos fermentados adicionados ou não de gérmen de soja, ao 1º, 15º e 30º dia de armazenamento a 4 °C

Amostra	Contagem de células de <i>L. reuteri</i> (log UFC.g ⁻¹)	pH	Acidez (g ácido láctico.100 g ⁻¹ produto)
EF 1	7,71 ^d ± 0,36	3,73 ^a ± 0,01	0,53 ^{e,f} ± 0,03
EF 15	7,69 ^d ± 0,25	3,25 ^{b,c} ± 0,01	0,64 ^{d,e} ± 0,01
EF 30	7,88 ^{c,d} ± 0,21	3,27 ^{b,c} ± 0,02	0,69 ^{c,d} ± 0,01
EGF 1	8,44 ^{a,b} ± 0,05	3,43 ^b ± 0,01	0,67 ^d ± 0,05
EGF 15	8,45 ^a ± 0,06	3,25 ^{b,c} ± 0,01	0,77 ^{b,c,d} ± 0,01
EGF 30	8,30 ^{a,b,c} ± 0,04	3,29 ^{b,c} ± 0,03	0,89 ^{a,b} ± 0,03
EGFA 1	7,64 ^d ± 0,04	3,79 ^a ± 0,01	0,44 ^f ± 0,01
EGFA 15	7,90 ^{b,c,d} ± 0,03	3,29 ^{b,c} ± 0,01	0,82 ^{a,b,c} ± 0,01
EGFA 30	7,87 ^{c,d} ± 0,13	3,19 ^c ± 0,09	0,91 ^a ± 0,02

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

EF: extrato de soja fermentado; EGF: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja; EGFA: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja e adoçado com 12% (m/m) de sacarose.

Após a fermentação, os valores de pH dos extratos adicionados ou não de gérmen de soja foram inferiores aos valores iniciais (6,70-6,80). Durante os 30 dias de estocagem, houve redução significativa ($p \leq 0,05$) de pH no EF e no EGFA (Tabela 13), embora a produção de ácido láctico tenha sido mais pronunciada no EGF e no EGFA. Conforme Wang et al. (2009b) o extrato de soja possui baixa capacidade tamponante em razão das propriedades físico-químicas das proteínas da soja, estando sujeito às oscilações de pH.

O pH do EGF permaneceu estável (Tabela 13), diante do aumento da acidez durante o armazenamento, que pode ser atribuído ao teor de proteínas do gérmen de soja. O acúmulo de ácido láctico nos extratos fermentados não prejudicou a viabilidade de *L. reuteri*. Champagne et al. (2009) relataram que o aumento de ácidos orgânicos durante o armazenamento e o decréscimo de pH são características de produtos fermentados, e poderiam contribuir para a redução da viabilidade celular.

5.8 Análise de Perfil de Textura

A análise de perfil de textura reproduz as condições que ocorrem na boca ao comprimir as amostras. Segundo Dutcosky (2011) a textura é a manifestação sensorial da estrutura interna dos produtos, em termos de reação à força medida como propriedades mecânicas (firmeza, consistência e coesividade). Na Tabela 14 observa-se que, exceto para coesividade, a presença de gérmen de soja aumentou significativamente as características de textura do extrato de soja fermentado ($p \leq 0,05$).

Tabela 14 - Análise de perfil de textura de EF, EGF e EGFA

	Firmeza (g)	Consistência (g.s)	Coesividade
EF	22,84 ^c ± 1,00	2,271 ^c ± 0,05	-0,146 ^a ± 0,01
EGF	142,25 ^a ± 2,00	12,844 ^a ± 0,61	-0,379 ^a ± 0,08
EGFA	90,70 ^b ± 3,00	7,991 ^b ± 0,57	-0,175 ^a ± 0,06

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

EF: extrato de soja fermentado; EGF: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja; EGFA: extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja e adoçado com 12% (m/m) de sacarose.

Segundo Szczesniak, Brandt e Friedman (1963) a firmeza é utilizada para estimar o máximo de força na primeira compressão, sendo um parâmetro crítico na avaliação da textura do alimento. Dentre as amostras analisadas, o EGF apresentou maior valor de firmeza (Tabela 14), decorrente da adição do gérmen de soja. O EGFA, embora contendo gérmen, obteve valores de firmeza inferiores aos de EGF, em razão da adição de sacarose.

A consistência é a velocidade na qual um material deformado volta à condição não deformada, após remoção da força de deformação, de acordo com Szczesniak, Brandt e Friedman (1963). Os valores de consistência obtidos nos extratos acompanharam os valores de firmeza, sendo $EFG > EGFA > EF$ (Tabela 14).

Conforme Szczesniak, Brandt e Friedman (1963) a coesividade é determinada como extensão a que um material pode ser deformado antes da ruptura. A coesividade de EF, EGF e EGFA foram estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$), revelando que a adição de gérmen de soja ou de sacarose não alterou a força das ligações internas na estrutura das amostras.

Yang e Li (2010) analisaram o perfil de textura de extratos fermentados de soja germinada, e encontraram valores de consistência (7,59 a 12,15) e de coesividade (-0,44 a -0,45) próximos aos valores obtidos neste trabalho. Para a firmeza, os valores foram inferiores (16,89-26,71), indicando que a presença do gérmen de soja favoreceu a firmeza nos extratos fermentados de soja.

5.9 Análise Sensorial

O teste triangular foi escolhido para detectar diferença (ao nível de 5% de significância) entre duas amostras que sofreram tratamentos distintos, cabendo aos provadores verificar se havia diferença entre as amostras A (extrato de soja fermentado com 3% (m/v) de gérmen de soja) e B (extrato de soja fermentado sem gérmen de soja). No teste participaram 35 pessoas, das quais 12 eram homens e 23 eram mulheres, com idade entre 15 a 50 anos.

Obedecendo ao delineamento sugerido por Instituto Adolfo Lutz (2008) para o teste triangular, foram obtidas 24 respostas corretas. O número mínimo para detecção da diferença ($p \leq 0,05$) era de 17 respostas corretas. Portanto, a amostra A difere da amostra B, ao nível de 5% de significância. O resultado reflete a percepção da diferença pelos provadores, que poderia ser percebida pelos consumidores. Nesse contexto, foi realizado um teste para determinar a aceitação do extrato fermentado com gérmen de soja.

O teste de aceitação foi aplicado para avaliar, utilizando uma escala hedônica de 9 pontos, os atributos de cor, aroma, textura, sabor e aceitação global da bebida fermentada à base de soja com 3% (m/v) de gérmen de soja e

12% (m/m) de sacarose. Foram convidadas 75 pessoas, das quais 41 eram homens e 34 eram mulheres. Cerca de 85,33% dos participantes tinham idade entre 15 a 25 anos. Dentre os convidados, conforme identificado na ficha de coleta de dados (Anexo C), 72% declararam gostar/consumir produtos à base de soja, 96% afirmaram gostar/consumir bebidas fermentadas, e 80% afirmaram consumir produtos fermentados contendo probióticos numa frequência moderada de ao menos uma vez ao mês.

Os escores médios da avaliação sensorial da bebida fermentada à base de soja com gérmen de soja e *L. reuteri* estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Escores de avaliação sensorial para bebida à base de soja com gérmen de soja e *L. reuteri*

Atributos	Notas
Cor	6,91 ± 1,43
Aroma	5,23 ± 2,05
Textura	6,07 ± 1,74
Sabor	4,93 ± 2,26
Aceitação Global	5,31 ± 1,83
Média (n=75) ± desvio padrão.	

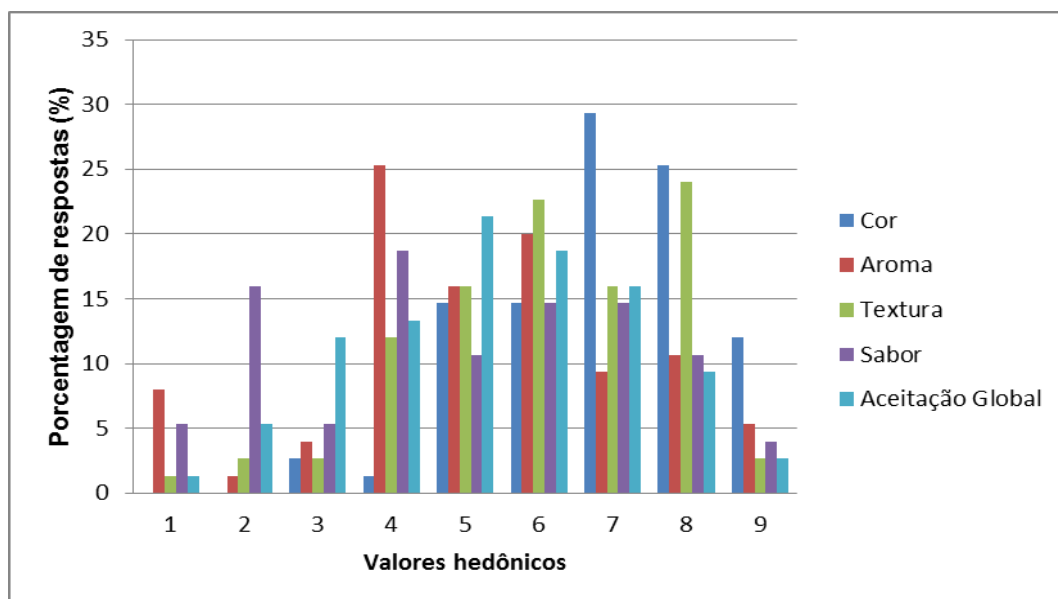
O atributo de cor obteve a maior média (Tabela 15), no qual 81,33% dos julgadores atribuíram notas entre 6 (gostei ligeiramente) a 9 (gostei extremamente) (Figura 12). A presença de gérmen de soja não alterou a cor original do extrato de soja, e em razão da boa aceitação obtida nesse atributo, a eventual adição de corantes artificiais mostra-se desnecessária.

O atributo de textura obteve média 6,07 ± 1,74 (Tabela 15), que corresponde ao “gostei ligeiramente”, no qual 65,34% dos julgadores atribuíram notas entre 6 a 9 (Figura 12). Já os atributos de aroma e sabor obtiveram índices moderados de rejeição, nos quais 38,66% dos julgadores atribuíram notas de 1 a 4 para aroma e 45,33% atribuíram notas de 1 a 4 para o sabor. Portanto, houve baixa aceitação do sabor e aroma natural da bebida de soja. Não houve adição de flavorizantes ou aromatizantes artificiais ao produto fermentado, o que poderia eventualmente aumentar as notas para os atributos

de aroma e sabor, e conseqüentemente elevar a nota de aceitação global da bebida de soja ($5,31 \pm 1,83$).

Embora tenha sido utilizada a soja da cultivar BRS 257, distinta pela baixa atividade das enzimas lipoxigenases e por proporcionar produtos com sabor e aroma mais agradáveis, a presença do gérmen de soja ao extrato conferiu um sabor residual levemente amargo em razão da presença de compostos como isoflavonas e saponinas, o que pode ter afetado na aceitabilidade do produto. Chang, Kim e Han (2010) avaliaram sensorialmente extratos de soja fermentados com culturas de *B. breve*, *S. Thermophilus* e *L. acidophilus*, e obtiveram notas de aceitação entre 3,22 e 4,72. Portanto, ainda há resistência e rejeição dos provadores frente ao consumo de bebidas fermentadas de soja, sugerindo modificações posteriores a fim de adequar a bebida às preferências do consumidor brasileiro.

Figura 12 - Porcentagem de respostas para teste sensorial de aceitação de bebida fermentada de soja com escala hedônica de 9 pontos



6 CONCLUSÃO

O crescimento de *L. reuteri* em extrato de soja da cultivar BRS 257, contendo 3% (m/v) de gérmen de soja, atinge contagens de células viáveis de 8-9 log UFC.g⁻¹ a 36 °C por 24 h. O fermentado obtido (EGF) apresenta o maior conteúdo de proteínas e de cinzas, a maior contagem de células viáveis e os maiores teores de fenólicos totais e de isoflavonas totais, quando comparado com as demais amostras, além dos maiores valores de firmeza e consistência para textura. O EGF apresenta estabilidade microbiológica e de atividade antioxidante durante 30 dias de armazenamento a 4 °C. A adição de 12% (m/m) de sacarose ao fermentado (EGFA) não prejudica a viabilidade celular e nem a atividade antioxidante nas condições de estocagem. No teste sensorial de EGFA, a nota média de aceitação global sugere modificações posteriores a fim de adequar a bebida às preferências do mercado brasileiro. O produto fermentado apresentou propriedades nutritivas, microbiológicas e funcionais satisfatórias, estabilidade durante o armazenamento e conteúdo de isoflavonas interessante para a promoção da saúde e para benefícios terapêuticos ao organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC, 1992. 46 p.

ARAI, S.; OSAWA, T.; OHIGASHI, H.; YOSHIKAWA, M.; KAMINOGAWA, S.; WATANABE, M.; OGAWA, T.; OKUBO, K.; WATANABE, S.; NISHINO, H.; SHINOHARA, K.; ESASHI, T.; HIRAHARA, T. A mainstay of functional food science in Japan – history, present status, and future outlook. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 65 (1), p. 1-13, 2001.

ARAI, Y.; WATANABE, S.; KIMIRA, M.; SHIMOI, K.; MOCHIZUKI, R.; KINAE, N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2243-50, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC, Washington, DC, 1995.

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

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos. São Paulo: Bookman, 4^a ed., 2010, 414 p.

BOLANHO, B.C.; BELÉIA, A.D.P. Bioactive compounds and antioxidant potential of soy products. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 22, p. 539-46, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v. 28 (1), p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades

Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jul 2002. p.191.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Atualizado em julho de 2008. IX – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 02 ago 2012.

CABRAL, M.R. Vitamina B12 e isoflavonas no extrato de soja adicionado de prebióticos e fermentado com probióticos. Dissertação de Mestrado de 2009 da Universidade Federal de Lavras, Lavras – Minas Gerais, 2009.

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

CASSIDY, A.; BROWN, J.E.; HAWDON, A.; FAUGHNAN, M.S.; KING, L.J.; MILLWARD, J.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B.; SETCHELL, K.D.R. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *Journal of Nutrition*, v. 136 (1), p. 45-51, 2006.

CHAMPAGNE, C.P.; GREEN-JOHNSON, J.; RAYMOND, Y.; BARRETTE, J.; BUCKLEY, N. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research Internacional*, v. 42, p. 612-21, 2009.

CHANG, S.Y.; KIM, D.-H.; HAN, M.J. Physicochemical and sensory characteristics of soy yogurt fermented with *Bifidobacterium breve* K-110, *Streptococcus thermophilus* 3781, or *Lactobacillus acidophilus* Q509011. *Food Science and Biotechnology*, v. 19, p. 107-13, 2010.

CHEN, K-I.; ERH, M-H.; SU, N-W.; LIU, W-H.; CHOU, C-C.; CHENG, K-C. Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, p. 9-22, 2012.

CHIEN, H.L.; HUANG, H.Y.; CHOU, C.C. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, v. 23, p. 772-8, 2006.

CHO, Y.A.; KIM, J.; LIM, S.Y.; PARK, K.S.; RO, J.; SHIN, A. Effect of dietary soy intake on breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 64, p. 924, 2010.

CHOI, I.; KIM, Y.; PARK, Y.; SEOG, H.; CHOI, H. Anti-obesity activities of fermented soygerm isoflavones by *Bifidobacterium breve*. *BioFactors*, v. 29, p. 105-12, 2007.

CHUN, J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. 4. *Food Chemistry*, v. 109, p. 278-84, 2008.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G.; TARONE, A.G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, p. 920-29, 2006.

CIABOTTI, S.; BARCELOS, M.F.P.; PINHEIRO, A.C.M.; CLEMENTE, P.R.; LIMA, M.A.C. Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27(3), p.643-48, 2007.

CLEUSIX, V.; DUBOUX, M.; LACROIX, C.; LE BLAY, G.; VOLLENWEIDER, S. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*, v. 7, p. 101, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Boletim de monitoramento agrícola – Culturas de verão - safra 2013/2014. Brasília: Conab, v. 3 (7), 1ª quin. Abr. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília: Conab, v. 1 (1), 2013.

COURI, S.; FELBERG, I.; TERZI, S.; DA SILVA, C.S. Bebida fermentada de soja. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, 2006, 35 p.

DE BOEVER, P.; DEPLANCKE, B.; VERSTRAETE, W. Fermentation of gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing soygerm powder. *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2599-606, 2001.

DE SOUZA, P. L.; RUSSEL, P.J.; KEARSLEY, J.H.; HOWES, L.G. Clinical pharmacology of isoflavones and its relevance for potential prevention of prostate cancer. *Nutrition Reviews*, v. 68 (9), p. 542-56, 2010.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Enhancing the biotransformation of isoflavones in soymilk supplemented with lactose using probiotic bacteria during extended fermentation. *Journal of Food Science*, v. 75 (3), p. M140-9, 2010.

DOLEYRES, Y.; BECK, P.; VOLLENWEIDER, S.; LACROIX, C. Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 68, p. 467-74, 2005.

DOMMELS, Y.E.M.; KEMPERMAN, R.A.; ZEBREGS, E.M.P.; DRAAISMA, R.B.; JOL, A.; WOLVERS, D.A.W.; VAUGHAN, E.E.; ALBERS, R. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75 (19), p. 6198-204, 2009.

DONG, J.Y.; QIN, L.Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Res Treat.*, v. 125 (2), p. 315-23, 2011.

DONKOR, O.N.; SHAH, N.P. Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Journal of Food Science*, v. 73 (1), p. M15-20, 2008.

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat, 2011, 3ª ed., 2011, p. 179-82.

EMBRAPA. Soja na Alimentação. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23#5. Acesso em 10 jun. 2012.

ESTEVES, E.A.; MARTINO, H.S.D.; OLIVEIRA, F.C.E.; BRESSAN, J.; COSTA, N.M.B. Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (LOX2 and LOX3). *Food Chemistry*, v. 122, p. 238-42, 2010.

EXPONENT STABLE MICRO SYSTEMS. Versão 6. Desenvolvido por Stable Micro Systems, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guideline for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, 2002. Disponível em :<www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em 28 abr. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Food labeling: Health claims, soy protein and coronary heart disease. *The Federal Register*, v. 57, p. 699-733, 1999.

FRANCAVILLA, R.; LIONETTI, E.; CASTELLANETA, S.; CIRUZZI, F.; INDRIO, F.; MASCIALE, A.; FONTANA, C.; LA ROSA, M.M.; CAVALLO, L.; FRANCAVILLA, A. Randomised clinical trial: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 vs. placebo in children with acute diarrhea – a double-blind study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 36, p. 363-9, 2012.

GÓES-FAVONI, S.P.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELEIA, A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. *Food Chemistry*, v. 119, p. 1605-12, 2010.

HANDA, C.L.; COUTO, U.R.; VICENSOTI, A.H.; GEORGETTI, S.R.; IDA, E.I. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, v. 152, p. 56-65, 2014.

HENRY, C.J. Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 64, p. 657, 2010.

HILAKIVI-CLARKE, L.; ANDRADE, J.E.; HELFERICH, W. Is soy consumption good or bad for the breast?. *Journal of Nutrition*, v. 140, p. 2326S-34S, 2010.

HO, H.M.; CHEN, R.Y.; LEUNG, L.K.; CHAN, F.L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.-Y. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 56, p. 289-95, 2002.

HSU, I.P.; JOU, H.J.; HUANG, C.W.; WANG, T.A.; WU, W.H. The effects of soygerm extracts on blood lipoprotein, antioxidative capacity and urinary estrogen metabolites in postmenopausal women on hormone therapy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 98, p. 29-33, 2007.

HUBERT, J.; BERGER, M.; NEPVEU, F.; PAUL, F.; DAYDÉ, J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soygerm. *Food Chemistry*, v. 109 (4), p. 709-21, 2008.

HUNG, P.V.; MAEDA, T.; MIYATAKE, K.; MORITA, N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research Internacional*, v. 42, p. 185-90, 2009.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. ZENEON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. (org). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

IZUMI, T.; PISKULA, M.K.; OSAWA, S.; OBATA, TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*, v. 130, n. 7, p. 1695-99, 2000.

JONES, M.L.; MARTONI, C.J.; TAMBER, S.; PARENT, M.; PRAKASH, S. Evaluation of safety and tolerance of microencapsulated *Lactobacillus reuteri*

NCIMB 30242 in a yoghurt formulation: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 2216-23, 2012.

KIM, S.-L.; LEE, J.-E.; KWON, Y.-U.; KIM, W.-H.; JUNG, G.-H.; KIM, D.-W.; LEE, C.-K.; LEE, Y.-Y.; KIM, M.-J.; KIM, Y.-H.; HWANG, T.-Y.; CHUNG, I.-M. Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. *Food Chemistry*, v. 136, p. 491-500, 2013.

LAI, L.-R.; HSIEH, S.-C.; HUANG, H.-Y.; CHOU, C.-C. Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferation activity of soymilk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 115, p. 552-6, 2013.

LIONETTI, E.; MINIELLO, V.L.; CASTELLANETA, S.P.; MAGISTA, A.M.; DE CANIO, A.; MAUROGIOVANNI, G.; IERARDI, E.; CAVALLO, L.; FRANCAVILLA, R. *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side-effects during anti-*Helicobacter pylori* treatment in children: a randomized placebo controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 24 (10), p. 1458-61, 2006.

LIU, J.R.; CHEN, M.J.; LIN, C.W. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 2467-74, 2005.

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

LIU, S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 83, p. 115-31, 2003.

LIU, W.; ZHANG, H.X.; WU, Z.L.; WANG, Y.J.; WANG, L.J. Recovery of isoflavone aglycones from soy whey wastewater using foam fractionation and acid hydrolysis. *Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 7366-72, 2013.

LOZOVAYA, V.V.; LYGIN, A.V.; ULANOV, A.V.; NELSON, R.L.; DAYDÉ, J.; WIDHOLM, J.M. Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. *Crop Science*, v. 45, p. 1934-40, 2005.

MARAZZA, J.A.; GARRO, M.S.; DE GIORI, G.S. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiology*, v. 26, p. 333-9, 2009.

MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; JIAN, R. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*, v. 88 (1), p. S51-7, 2002.

MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on beta-glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin – isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 59, p. 1623-27, 1995.

MESSINA, M. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *Journal of Nutrition*, v. 140 (7), p. 1350S-54S, 2010.

MORAES FILHO, M.L.; HIROZAWA, S.S.; PRUDENCIO, S.H.; IDA, E.I.; GARCIA, S. Petit suisse from black soybean: bioactive compounds and antioxidant properties during development process. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 65, p. 1-6, 2014.

MURPHY, P.A.; BARUA, K.; HAUCK, C.C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *Journal of Chromatography*. v. 777, p. 129-38, 2002.

NOGUCHI, A.; SAITO, A.; HOMMA, Y.; NAKAO, M.; SASAKI, N.; NISHINO, T.; TAKAHASHI, S.; NAKAYAMA, T. A UDP-glucose: isoflavone 7-O-glucosyltransferase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and an implication for an alternative strategy of enzyme catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 23581-90, 2007.

OKUBO, K.; IJIMA, M.; KOBAYASHI, Y.; YOSHIKOSHI, M. UCHIDA, T. KUDOU, S. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*., v. 56 (1), p. 99-103, 1992.

OTIENO, D.O.; ASHTON, J.F.; SHAH, N.P. Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected β -glucosidase producing *L. acidophilus* strains during storage at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 115, p. 79-88, 2007.

OTIENO, D.O.; SHAH, N.P. Endogenous beta-glucosidase and beta-galactosidase activities from selected probiotic micro-organisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103 (4), p. 910-17, 2007.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, S.A.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, p. 1171-85, 2006.

PATEL, H.M.; PANDIELLA, S.S.; WANG, R.H.; WEBB, C. Influence of malt, wheat, and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli. *Food Microbiology*, v. 21, p. 83-9, 2004.

PAUCAR-MENACHO, L.M.; BERHOW, M.A.; MANDARINO, J.M.G.; MEJIA, E.G.; CHANG, Y.K. Optimisation of germination time and temperature on the concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 119, p. 636-42, 2010.

PENNONE, A. J. J. Projeto de identificação, classificação e padronização do leite de soja. Brasília, DF: ABPLS, 1989. 30 p.

PRADO F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, v. 41, p. 111-23, 2008.

RAIMOND, S.; RONCAGLIA, L.; DE LUCIA, M.; AMARETTI, A.; LEONARDI, A.; PAGNONI, U.M.; ROSSI, M. Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 943-50, 2009.

REKHA, C.R.; VIJAYALAKSHMI, G. Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with β -glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v. 62 (2), p. 111-20, 2011.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, v. 27, p. 1-11, 2010.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease, Rome*, v. 34 (2), p. S105-10, 2002.

ROBINSON, D.S.; WU, Z.; DOMONEY, C.; CASEY, R. Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chemistry*, v. 54, p. 33-43, 1995.

RODRIGUEZ-ROQUE, M.J.; ROJAS-GRAU, M.A.; ELEZ-MARTINEZ, P.; MARTIN-BELLOSO, O. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, v. 136, p. 206-12, 2013.

ROMANO, C.; FERRAU, V.; CAVATAIO, F.; IACONO, G.; SPINA, M.; LIONETTI, E.; COMISI, F.; FAMIANI, A.; COMITO, D. *Lactobacillus reuteri* in children with functional abdominal pain (FAP). *Journal of Pediatrics and Child Health*, online version, 2010.

ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; CABRAL, L.M.C.; CABRAL, L.C.; FARIAS, C.A.A.; DOMINGUES, A.M. Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. *Food Control*, v. 14, p. 187-92, 2003.

ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, v. 1012, p. 119-28, 2003.

ROSTAGNO, M.A.; VILLARESA, A.; GARCÍA-LAFUENTE, A., MARTÍNEZ, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 2-29, 2009.

RÜFER, C.E.; KULLING, S.E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54 (8), p. 2926-31, 2006.

SANCHES-GONZALES, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. *In vitro* antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). *Food Chemistry*, v. 90, p. 133-9, 2005.

SAVINO, F.; PELLE, E.; PALUMERI, E.; OGGERO, R.; MINIERO, R. *Lactobacillus reuteri* (american type culture collection strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics*, v. 119 (1), p. E124-30, 2007.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68 (6), p. 1333S-46S, 1998.

SHORNIKOVA, A.; CASAS, I.A.; MYKKÄNEN, H.; SALO, E.; VESIKARI, T. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 16 (12), p. 1104-07, 1997.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. S287-90, 2011.

SINKIEWICZ, G. *Lactobacillus reuteri* in health and disease. Malmö University Health and Society Doctoral Dissertations 2010:3, Holmbergs – Malmö, 2010.

SLAVIN, M.; KENWORTHY, W.; YU L. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of Maryland-grown soybeans with colored seed coats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 11174-85, 2009.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, p. 1474S-9S, 1998.

SONG, T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Estrogenic Activity of glycitein, a soy isoflavone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 1607-10, 1999.

SPINLER, J.K.; TAWEECHOTIPATR, M.; ROGNERUD, C.L.; OU, C.N.; TUMWASORN, S.; VERSALOVIC, J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, v. 14, p. 166-71, 2008.

STATISTICA. Versão 8. Desenvolvido por Statsoft® Inc, 2007.

STEINBERG, F.M.; MURRAY, M.J.; LEWIS, R.D.; CRAMER, M.A.; AMATO, P.; YOUNG, R.L.; BARNES, S.; KONZELMANN, K.L.; FISCHER, J.G.; ELLIS, K.J.; SHYPAILO, R.J.; FRALEY, J.K.; SMITH, E.O.; WONG, W.W. Clinical outcomes of a 2-y soy isoflavones supplementation in menopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 93, p. 356-67, 2011.

SZCZESNIAK, A.S.; BRANDT, M.; FRIEDMAN, H.H. Development of standart rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science*, v. 28, p. 397-403, 1963.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* – the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 10, p. 63-8, 1959.

TAKU, K.; UMEGAKI, K.; SATO, Y.; TAKI, Y.; ENDOH, K.; WATANABE, S. Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 85, p. 1148-56, 2007.

TALARICO, T.L; DOBROGOSZ, W.J. Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 56 (4), p. 1195-97, 1990.

TORO-FUNES, N.; ODRIUZOLA-SERRANO, I.; BOSCH-FUSTE, J.; LATORRE-MORATALLA, M.L.; VECIANA-NOGUES, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M.C. Fast simultaneous determination of free and conjugates isoflavones in soy Milk by UHPLC-UV. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2832-38, 2012.

TSANGALIS, D.; ASHTON J.F.; STOJANOVSKA, L.; WILCOX, G.; SHAH, N.P. Development of an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein isolate and bifidobacteria. *Food Research International*, v.37, p. 301-12, 2004.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 1184-92, 1995.

TYUG, T.S.; PRASAD, K.N.; ISMAIL, A. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chemistry*, v. 123, p. 583-9, 2010.

UESUGI, T.; TODA, T.; TSUJI, K.; ISHIDA, H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin and glycitin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, p. 368-72, 2001.

USDA WORLD AGRICULTURAL SUPPLY AND DEMAND ESTIMATES (WASDE) Report (2013). Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Acesso em: 08 mar 2013.

VALEUR, N.; ENGEL, P.; CARBAJAL, N.; CONNOLLY, E.; LADEFOGED, K. Colonization and Immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in

the Human Gastrointestinal Tract. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70 (2), p. 1176-81, 2004.

VAMERALI, T.; BARION, G.; HEWIDY, M.; MOSCA, G. Soybean isoflavone patterns in main stem and branches as affected by water and nitrogen supply. *European Journal of Agronomy*, v. 41, p. 1-10, 2012.

VERGNE, S.; TITIER, K.; BERNARD, V.; ASSELINEAU, J.; DURAND, M.; LAMOTHE, V.; POTIER, M.; PEREZ, P.; DEMOTES-MAINARD, J.; CHANTRE, P.; MOORE, N.; BENNETAU-PELISSERO, C.; SAUVANT, P. Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: effects of soy-based supplements formulation and equol production. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 1488-94, 2007.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Phytochemical profiles and health-promoting effects of cool-season food legumes as influenced by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 10718-31, 2009.

WALZEM, R. L. Functional Foods. *Trends in Food Science and Technology*. v. 15, p. 518, 2004.

WANG, B.F.; WANG, J.S.; LU, J.F.; KAO, T.H.; CHEN, B.H. Antiproliferation effect and mechanism of prostate cancer cell lines as affected by isoflavones from soybean cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57 (6), p. 2221-32, 2009a.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44 (8), p. 2377-83, 1996.

WANG, J.; GUO, Z.; ZHANG, Q.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.-M.; ZHANG, H.-P. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 2468-76, 2009b.

WANG, Y.C.; YU, R.C.; YANG, H.Y.; CHOU, C.C. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. *Food Microbiology*, v. 20 (2003), p. 333–38, 2003.

WEI, Q.-K.; CHEN, T.-R.; CHEN, J.-T. Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 177, p. 120-4, 2007.

WEIZMAN, Z.; ALSHEIKH, A. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 25 (5), p. 415-19, 2006.

WISEMAN, H.; CASEY, K.; CLARKE, D.B.; BARNES, K.A.; BOWEY, E. Isoflavone aglycone and glucoconjugate content of high- and low-soy U.K.

foods used in nutritional studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 1404–10, 2002.

WOLF, B.W.; WHEELER, K.B.; ATAYA, D.G.; GARLEB, K.A. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36 (12), p. 1085-94, 1998.

WONG, J.M.W.; KENDALL, C.W.C.; MARCHIE, A.; LIU, Z.; VIDGEN, E.; HOLMES, C.; JACKSON, C.; JOSSE, R.G.; PENCHARS, P.B.; RAO, A.V.; VUKSAN, V.; SINGER, W.; JENKINS, D.J.A. Equol status and blood lipid profile in hyperlipidemia after consumption of diets containing soy foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 95, p. 564-71, 2012.

YANG, M.; LI, L. Characteristics of probiotic soy yogurt. *Food Technology and Biotechnology*, v. 48, p. 490-6, 2010.

YOSHIARA, L.Y.; MADEIRA, T.B.; DELAROZA, F.; SILVA, J.B.; IDA, E.I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v. 9, p. 978-86, 2012.

YU, D.; ELAFALLEH, W.; HE, S.; MA, Y.; JIANG, L.; LI, L.; HU, L.; ZHANG, J. Physicochemical properties and minor lipid components of soybean germ. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 90, p. 1551-58, 2013.

YUAN, J.-P.; LIU, Y.-B.; PENG, J.; WANG, J.-H.; LIU, X. Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 9002-10, 2009.

YUAN, B.; ZHEN, H.; JIN, Y.; XU, L.; JIANG, X.; SUN, S.; LI, C.; XU, H. Absorption and plasma disposition of genistin differ from those of genistein in healthy women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60 (6), p. 1428-1436, 2012.

ZHANG, X.; GAO, B.; SHI, H.; SLAVIN, M.; HUANG, H.; WHENT, M.; SHENG, Y.; YU, L. Chemical composition of 13 commercial soybean samples and their antioxidant and anti-inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 10027-34, 2012.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa - UEL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: BEBIDA A BASE DE SOJA COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Pesquisador: Sandra Garcia

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 07701612.7.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 117.629

Data da Relatoria: 08/10/2012

Apresentação do Projeto:

O presente estudo visa desenvolver um produto alimentício a base de extrato hidrossolúvel de soja, adicionado de gérmen de soja, com teor de isoflavonas interessante para o consumo e uma alternativa de alimento em dietas restritivas. A fermentação com cultura probiótica contribuirá com o desenvolvimento das características sensoriais, bem como na adição de micro-organismos potencialmente probióticos. O produto final visa ser aceito sensorialmente, e proporcionar benefícios ao consumidor em virtude das propriedades associadas aos componentes presentes na soja, no gérmen de soja e na cultura probiótica utilizada.

Objetivo da Pesquisa:

- **Objetivo Geral:** Elaborar um produto funcional a partir do extrato hidrossolúvel de soja, utilizando gérmen de soja e cultura probiótica.

Objetivos Específicos:

- 1 - Desenvolver uma bebida fermentada a partir do extrato de soja, utilizando cultura probiótica comercial; 2 - Adicionar gérmen de soja à bebida em quantidade suficiente para atuação das isoflavonas no organismo; 3 - Determinar a composição centesimal do produto; 4 - Avaliar o crescimento bacteriano, a produção de ácido durante o processo de fermentação e a metabolização bacteriana dos componentes do extrato e do gérmen de soja; 5 - Avaliar a estabilidade do produto durante o período de 28 dias à 4°C e verificar a viabilidade do *Lactobacillus reuteri* durante o período de estocagem, determinar o perfil e o conteúdo de

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



isoflavonas por CLUAE e a capacidade antioxidante através de métodos de sequestro do radical livre DPPH₂ e força redutora e 6 - Avaliar as características sensoriais e aceitabilidade do produto final.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- riscos e benefícios:

"Por ser um produto probiótico, poderão ocorrer benefícios associados ao consumo, como um menor tempo de trânsito intestinal. Por outro lado poderão ocorrer alguns desconfortos abdominais, mesmo que raramente, como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, cessados algumas horas após o consumo do produto" (retirado do texto em word do projeto).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- número de sujeitos de pesquisa = 150 indivíduos, selecionados entre servidores e estudantes do Centro de Ciências Agrárias (CCS) da UEL, sendo:

50 julgadores no teste de preferência e

100 consumidores

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados:

1 - Folha de Rosto: assinam a pesquisadora (orientadora) e a coordenadora do programa de PG;

2 - Instituição Co-participante: há autorização do diretor do Centro de Ciências Agrárias da UEL já que os voluntários serão servidores e alunos deste centro de estudos da UEL;

3 - TCLE adequado;

4 - cronograma adequado, prevendo o início da coleta de dados para após a aprovação do estudo pelo CEP;

5 - orçamento (R\$ 15.200,00) e financiamento (a cargo do DCTA e Programa de Pós Graduação): adequados.

Recomendações:

- não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- não há pendências ou inadequações

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer referendado

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



LONDRINA, 08 de Outubro de 2012

Assinador por:
Paula Mariza Zedu Alliprandini
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

CEP: 86.038-440

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na forma de convite para produto fermentado de soja na análise de aceitação

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo da pesquisa:
“Bebida à Base de Soja com Propriedades Funcionais”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “Bebida à Base de Soja com Propriedades Funcionais”, realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UEL, Londrina-PR. O objetivo da pesquisa é desenvolver uma bebida à base de extrato de soja e fermentada com cultura probiótica (*Lactobacillus reuteri*). A sua participação é muito importante e irá requerer cerca de quinze minutos. Você participará como provador e irá consumir uma bebida formulada com extrato e gérmen de soja, fermentadas com cultura probiótica, sendo solicitado a dar sua opinião informando a ordem crescente de preferência das bebidas analisadas. Será realizada uma sessão e você poderá participar no horário em que tiver maior disponibilidade. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os benefícios esperados são diminuição no tempo de trânsito intestinal e auxílio na prevenção de doenças crônicas. A sua ingestão não traz riscos à saúde, entretanto, raramente, podem ocorrer desconfortos abdominais como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, que deverão cessar algumas horas após o consumo do produto. Informamos que não haverá pagamento, nem remuneração por sua participação. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia ou Suzana Tiemi Matsubara, DCTA-UEL) no telefone (43) 3371-5966 ou no e-mail sgarcia@uel.br / suannya@gmail.com, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual

de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido e assinado em duas vias de igual teor, sendo uma delas entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 2013.

Pesquisador Responsável
Profª. Drª. Sandra Garcia

Mestranda
Suzana Tiemi Matsubara

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

ANEXO C – Modelo de ficha para a coleta de dados do provador

COLETA DE DADOS DO PROVADOR

Dados Pessoais:

Nome: _____

E-mail: _____

1. Faixa etária:

- 15-25
- 25-35
- 35-50
- acima de 50 anos

3. Ocupação:

- aluno: graduação pós-graduação
- funcionário
- professor
- outro _____

5. Gosta/consome bebida fermentada? () Sim () Não

6. Gosta/consome produtos de soja? () Sim () Não

7. Frequência de consumo de produtos a base de soja:

- Frequentemente - _____ vezes por semana
- Moderadamente - _____ vezes por mês
- Ocasionalmente - _____ vezes por ano
- Nunca

8. Frequência de consumo de produtos fermentados contendo probióticos:

- Frequentemente - _____ vezes por semana
- Moderadamente - _____ vezes por mês
- Ocasionalmente - _____ vezes por ano
- Nunca

9. Produtos que costuma consumir (7 e 8).

ANEXO D - Modelo de ficha para o teste triangular

TESTE TRIANGULAR		
Nome:		
Data...../...../.....		
<p>Você esta recebendo 3 amostras codificadas. Prove cada uma das amostras e avalie se existe diferença, em termos globais, entre as amostras apresentadas. Circule o código da amostra que diferir das demais.</p>		
.....
Observações:		

ANEXO E: Modelo de ficha para o teste de aceitação dos atributos sensoriais estruturados em escala hedônica de 9 pontos

TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de bebida funcional à base de soja. Por favor, avalie a amostra com relação aos atributos cor, sabor, textura, aroma, aparência e aceitação global, utilizando a escala abaixo para dizer o quanto gostou ou desgostou do produto e, se desejado, faça comentários sobre ele.

- (1) Desgostei muitíssimo
- (2) Desgostei muito
- (3) Desgostei
- (4) Desgostei ligeiramente
- (5) Não gostei, nem desgostei
- (6) Gostei ligeiramente
- (7) Gostei
- (8) Gostei muito
- (9) Gostei muitíssimo

AMOSTRA	COR	SABOR	TEXTURA	AROMA	ACEITAÇÃO GLOBAL

Você consumiria esse produto? _____

Comentários: _____

ANEXO F – Página de acesso do *Curriculum lattes* dos pesquisadores envolvidos na pesquisa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia

Endereço de acesso do CV: <<http://lattes.cnpq.br/6040080684084312>>

Orientada em nível de Mestrado: Suzana Tiemi Matsubara

Endereço de acesso: <<http://lattes.cnpq.br/2113062855695364>>