



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARSILVIO LIMA DE MORAES FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE
PROBIÓTICO A BASE DE EXTRATO DE SOJA PRETA**

Londrina
2013

MARSILVIO LIMA DE MORAES FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE
PROBIÓTICO A BASE DE EXTRATO DE SOJA PRETA**

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.

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

Londrina
2013

MARSILVIO LIMA DE MORAES FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE
PROBIÓTICO A BASE DE EXTRATO DE SOJA PRETA**

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

Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia

UEL - Londrina - PR

Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Luiz Ribeiro

UEL - Londrina - PR

Dr^a. Josemeiry Bonifácio da Silva

UEL - Londrina - PR

Londrina, 06 de Março de 2013.

Dedicatória

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me concedido o privilégio de conquistar todos os meus sonhos, tendo sempre ao meu lado pessoas que me amam e torcem pelo meu sucesso.

Aos meus pais, Marsilvio e Ednubia, por serem meu porto seguro, onde sempre sei que posso encontrar amigos e contar, seja nos momentos de felicidade ou tristeza, dando-me amor e ensinamentos que irei levar comigo para sempre.

À minha querida irmã Rebeca, por me escutar, por me fazer rir e por sentir orgulho de mim, muito obrigado minha amiga.

Aos amigos e familiares. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Sandra Garcia pelo carinho, paciência e ensinamentos demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Elza Ida pelos ensinamentos e disponibilidade do UPLC.

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de aprendizado.

À chefia e coordenação do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e colaboração.

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

À mestrandia Cintia Ladeira Handa por todo carinho, amizade, auxílio, força, determinação e alegria demonstrados, tornando os meus dias mais alegres.

Ao mestrando Thiago Montagner Souza pelo auxílio prestado durante todo o curso.

À Doutoranda Angélica Tiemi Ishikawa pela amizade, carinho e risadas que alegraram meus dias.

À estagiária Aline Heloisa Vicensoti pelo auxílio, paciência e amizade.

Ao estagiário Matheus Cicaglioni pelo auxílio durante a parte experimental do projeto.

À Sabrina Satie Hirozawa pelo carinho, alegria e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Neusa C. dos Santos, Elza Youssef, Berenice, Sandra Rezende, Alessandra, Rubens Borges Santos, Maria Alice Carlos, Célia Primo e Dona Marília.

AGRADECIMENTO PESSOAL

A Deus pela fé e força, nos momentos difíceis e por não me deixar desistir dos meus sonhos, pois tudo posso naquele que me fortalece.

Aos meus pais, Marsilvio Lima de Moraes e Ednubia Rodrigues de Moraes por terem me dado à vida, mas acima de tudo, por terem me amado e me ensinado a importância de se ter caráter. Obrigado pelo amor, compreensão, dedicação, pois aonde quer que eu chegue, devo isto a Deus e a vocês.

À minha querida irmã, Rebeca Rodrigues de Moraes pelo carinho, companheirismo, alegria e compreensão.

À minha avó Maria do Socorro pela paciência, carinho, preocupação e apoio.

Aos meus amigos, Cintia Ladeira Handa, Thiago Montagner Souza, Wagner Risso, Angélica Ishikawa, Karla Guergoletto, Marinês Corso, Tahis Baú, Marianne Shirai, Maria Rita Alaniz Porto, Diogo Gimenes Pedrollo, pela amizade, alegria e companheirismo.

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

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

Albert Einstein

MORAES FILHO, M. L. **Desenvolvimento de queijo tipo petit suisse probiótico a base de extrato de soja preta**, 2013. Sandra Garcia. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

RESUMO

A soja preta [*Glycine max (L.) Merrill*] é uma variedade pouco conhecida no Brasil, que além de possuir os benefícios relacionados ao consumo da soja, apresenta antocianinas em sua casca, auxiliando na atividade antioxidante. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um queijo tipo *petit suisse* funcional contendo linhagens probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*). Foi utilizado extrato de soja preta com adição de polpa de amora preta, caracterizando o produto durante o armazenamento a 4°C por 30 dias, bem como o grão integral de soja preta, o extrato aquoso de soja preta e o quark quanto à composição química, identificação e quantificação de isoflavonas por UPLC, fenólicos totais, atividade antioxidante (ensaios *in vitro* DPPH[·] e o cátion radical ABTS^{·+}) e atividade da enzima β-glicosidase. Foram realizadas determinações de pH, acidez titulável e cor para o extrato de soja preta (ESP), extrato de soja preta sem casca (ESP S/C), extrato de soja preta fermentado (ESPF), quark e *petit suisse* durante o armazenamento. Para as amostras de quark e *petit suisse* foram analisadas capacidade de retenção de água e viscosidade. A viabilidade microbiana foi avaliada para o *petit suisse* ao longo do armazenamento por meio de contagem de bactérias lácticas totais, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, sendo o produto submetido a análise sensorial. As amostras apresentaram composição química distintas, variando quanto ao teor e composição de isoflavonas, tendo o grão integral 80 mg/100g, extrato de soja preta 100 mg/100g, quark 90 mg/100g e *petit suisse* 60 mg/100g aproximadamente para isoflavonas totais. Os teores de antocianinas variaram, tendo o ESP o maior teor em base seca, sendo 385 e 360 mg/100g respectivamente para antocianinas totais e monoméricas, resultando em valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) para os ensaios de atividade antioxidante *in vitro* (DPPH[·] e ABTS^{·+}) para todas as amostras. Ao longo do armazenamento houve queda gradual do pH e aumento da acidez para as amostras ESPF, Quark e *Petit suisse* e em consequência alterações em sua coloração. Não houve diferença significativa para capacidade de retenção de água e viscosidade entre as amostras de quark e *petit suisse*. O queijo tipo *petit suisse* probiótico apresentou em média contagens da ordem de 9,48 log UFC.g⁻¹ de lácticas totais, com uma média de 7,77 log UFC.g⁻¹ e 9,64 log UFC.g⁻¹ para *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* respectivamente até 30 dias de armazenamento a 4°C, sendo assim, classificado na legislação brasileira como um produto probiótico.

Palavras-chave: Antocianinas; antioxidante; *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*; Isoflavonas; *Lactobacillus acidophilus*.

MORAES FILHO, M. L. **Development of probiotic soy petit suisse cheese from black soybean soymilk**, 2013. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Londrina State University. Londrina,

ABSTRACT

Black Soybean [*Glycine max (L.) Merrill*] is a little known variety in Brazil, which also has the benefits related to soy consumption, anthocyanins present in your seed coat, aiding in antioxidant activity. The objective of this study were to develop a functional soy petit suisse cheese with soymilk of black soybean and mulberry pulp containing probiotic strains (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*), evaluating the product during storage at 4 ° C for 30 days as well as the whole grain of black soybean, the soymilk of black soybean and quark as to chemical composition, identification and quantification of isoflavones by UPLC, phenolics, antioxidant activity (assay in vitro with DPPH· and the cation radical ABTS +·) and activity β-glucosidase enzyme. Measurements of pH, titratable acidity and color were performed in soymilk of black soybean (SMBS), soymilk of black soybean dehulled (SMBSD), soymilk of black soybean fermented (SMBSF), quark and *petit suisse* during storage and performed as well as for samples of quark and *petit suisse* analysis of water holding capacity and viscosity, during the storage. Viability of *petit suisse* lactic acid bacteria counts were monitored as well as *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* counts using differential agars. The product was submitted for test of acceptability through sensory analysis and showed global acceptance satisfactory (7,0) by hedonic scale. The samples showed different chemical composition, varying the composition and distribution of isoflavones (grains showed approximately 80 mg/100g, SMBS 100 mg/100g, Quark 90 mg/100g and Petit suisse 60 mg/100g for total isoflavones). The contents of anthocyanins varied, the AEBS having the highest content on a dry basis, being 385 and 360 mg/100g respectively for total and monomer anthocyanin, resulting in significantly different values ($p < 0.05$) for the activity assays in vitro antioxidant (DPPH· and ABTS +·) for all samples. During the storage there was a gradual decrease in pH and increasing acidity of some samples, reflected in color changes. The product exhibited satisfactory counts for *Lactobacillus acidophilus* (7,77 Log CFU.g⁻¹) and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (9,64 Log CFU.g⁻¹) after 30 days of storage, therefore, classified as a source of probiotics.

Keywords: Anthocyanins, antioxidant; *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*; isoflavones; *Lactobacillus acidophilus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral de um flavonóide.....	17
Figura 2 – Estrutura geral das 12 isoflavonas encontradas na soja	18
Figura 3 – Estrutura geral antocianina.....	20
Figura 4 – Fluxograma para obtenção do extrato de soja preta (ESP).....	27
Figura 5 – Fluxograma para obtenção do <i>petit suisse</i> sabor amora.....	28
Figura 6 – Modelo de ficha para teste sensorial escala-do-ideal.....	37
Figura 7 – Modelo de ficha para teste sensorial escala hedônica	37
Figura 8 – Perfil cromatográfico de isoflavonas por UPLC	42
Figura 9 – Gráfico para os parâmetros pH e cor	48
Figura 10 – Gráfico Julgadores x Escala Hedônica.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química.....	38
Tabela 2 – Atividade de β -glicosidase e isoflavonas.....	40
Tabela 3 – Fenólicos totais, antocianinas totais e monoméricas, atividade antioxidante (DPPH \cdot e ABTS $^{+}$).....	44
Tabela 4 – Valores de L*, a*, b*, pH e acidez titulável.....	47
Tabela 5 – Capacidade de retenção de água e viscosidade	49
Tabela 6 – Contagem lácticas totais, <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	51
Tabela 7 – Aceitação sensorial de queijo tipo <i>petit suisse</i> de soja preta.	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA SOJA	16
3.2 SOJA PRETA	19
3.3 EXTRATO DE SOJA (EAS)	21
3.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS	21
3.5 PROBIÓTICOS	22
3.5.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
3.5.2 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	24
3.6 PETIT SUISSE	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAL	26
4.1.1 Soja Preta	26
4.1.2 Cultura Probiótica	26
4.1.3 Polpa de Amora Preta	26
4.2 MÉTODOS	26
4.2.1 Preparo dos Inóculos	26
4.2.2 Obtenção do ESP	27
4.2.3 Preparo do Produto	27
4.2.4 Determinação e Quantificação de Isoflavonas por CLUAE	28
4.2.5 Avaliação da Composição Centesimal.	29
4.2.6 pH	30
4.2.7 Determinação da Acidez Titulável	30
4.2.8 Capacidade de Retenção de Água	30
4.2.9 Viscosidade	30
4.2.10 Contagem de Bactérias lácticas	31
4.2.11 Contagem diferencial de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	31
4.2.12 Contagem diferencial de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	31

4.2.13 Atividade da Enzima β -glicosidase.....	31
4.2.14 Fenólicos totais	32
4.2.15 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radical livre DPPH....	33
4.2.16 Capacidade antioxidante: Capacidade de Sequestrar Cátion Radical ABTS+	33
4.2.17 Antocianinas Totais e Monoméricas.....	34
4.2.18 Medida de Cor.....	35
4.2.19 Análise Estatística	35
4.2.20 Condições Higiênico-Sanitárias.....	35
4.2.21 Análise Sensorial.....	35
4.2.22 Teste Sensorial Escala-do-Ideal.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	38
5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ISOFLAVONAS POR UPLC	39
5.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	43
5.4 COLORAÇÃO DOS PRODUTOS, PH E ACIDEZ TITULÁVEL.....	46
5.5 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E VISCOSIDADE	49
5.6 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM QUEIJO TIPO PETIT SUISSE	50
5.7 ANÁLISE SENSORIAL DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE	52
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	65

1. INTRODUÇÃO

Há uma busca crescente de produtos naturais pela população, tendo os consumidores, nos últimos anos, acesso a informação e disseminação da importância de uma alimentação mais saudável. A indústria tem diversificado os produtos oferecidos. Dentre estes, encontram-se os produtos fermentados, destacando-se os que possuem alegações funcionais. Estes produtos podem apresentar semelhanças visuais aos tradicionais, entretanto, com diferenças nutricionais, que proporcionam outros benefícios a quem consumi-los regularmente.

Por definição, alimentos considerados probióticos apresentam microrganismos viáveis e em número suficiente para alterar a microbiota do hospedeiro através da colonização, o que proporciona benefícios à saúde, como aumento da defesa do organismo contra patógenos.

Dentre o grande número de alimentos divulgados como benéficos à saúde, destaca-se a soja como um dos principais. Estudos associam o consumo de soja na prevenção de inúmeras doenças como câncer, osteoporose e doenças cardiovasculares. Estes benefícios estão associados às características químicas e nutricionais da soja. Dentre as cultivares de soja, a preta se diferencia por sua casca escura, possuindo além de características próprias da soja como fonte de isoflavonas e proteínas, a presença de antocianinas que acentuam a atividade antioxidante.

Isoflavonas e antocianinas são polifenóis, da classe dos flavonóides. Existem 12 isômeros de isoflavonas encontrados na soja, sendo seu consumo associado a diversos benefícios para a saúde. Antocianinas são glicosídeos de antocianidinas, associados à coloração de flores, frutas e seu consumo também está relacionado a benefícios a saúde.

Considerando a importância da soja na saúde humana, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um queijo tipo *petit suisse* a partir de extrato de soja preta fermentado com cultura probiótica e avaliar as características físicas, químicas e sensoriais deste produto e comparar com as características do grão, extrato de soja com e sem casca e quark.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade durante o armazenamento de um produto funcional contendo linhagens probióticas utilizando extrato aquoso de soja preta.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Caracterizar o grão, o extrato aquoso, o quark e o *petit suisse*, durante armazenagem por 30 dias à 4°C, quanto à composição química, teor de isoflavonas, fenólicos totais, capacidade antioxidante, antocianinas totais e monoméricas.
- Avaliar a estabilidade do extrato aquoso, quark e *petit suisse* durante armazenagem por 30 dias à 4°C, por meio de medidas de pH, acidez titulável e medidas de cor.
- Avaliar o quark e *petit suisse* durante armazenagem por 30 dias à 4°C quanto à capacidade de retenção de água e viscosidade.
- Determinar em *petit suisse* a contagem total de bactérias lácticas, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.
- Avaliar sensorialmente o produto.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA SOJA

A soja [*Glycine max (L.) Merrill*] é uma planta de consumo milenar, datando de mais de 2000 anos. Está presente principalmente na alimentação oriental, sendo uma das principais fontes de proteínas, consumida nas mais variadas formas, tais como, molho de soja, tofu e extrato de soja (ROSA et al., 2009). Presente no Brasil desde o final do século XIX recebeu maior atenção a partir do final da década de 60, como fonte de proteínas de alta qualidade (BRANDÃO; REZENDE; MARQUES, 2006; FUKUSHIMA, 2001).

O Brasil ocupa a 2ª colocação como produtor mundial de soja, atrás dos EUA, tendo na safra 2009/2010 ocupado uma área 23,6 milhões de hectares com produção de 68,7 milhões de toneladas. Em média, o grão de soja apresenta 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos. Entretanto, as características nutricionais sofrem influência de diversos fatores, tais como genéticos, cultivar, características climáticas, entre outros (GOLBITZ; JORDAN, 2006; CORREA et al., 2010; EMBRAPA, 2011). A soja é considerada a fonte protéica de origem vegetal de melhor qualidade quando comparada a de origem animal devido à presença de aminoácidos essenciais. É um dos grãos com o maior teor de isoflavonas e está presente na dieta humana em derivados protéicos como farinha desengordurada texturizada, concentrados e isolados (FICHER et al,1975; GOLBITZ, JORDAN, 2006).

O consumo de soja em muitos países ainda é baixo devido ao sabor característico resultante da ação da enzima lipoxigenase, o que contribui para a baixa aceitabilidade da soja e seus derivados. Muitos compostos que conferem sabor à soja e a seu extrato já foram elucidados, dentre estes, aldeídos, acetais, ésteres, hidrocarbonetos e cetonas (BEHRENS; SILVA, 2004; MORAES et al., 2006).

As frações proteicas da soja são 2S, 7S, 11S e 15S correspondendo respectivamente a 15%, 34%, 41,9% e 9,1%. A fração 2S possui proteínas biologicamente ativas, inibidores de tripsina e globulinas 2S. A fração 7S é composta pelas enzimas β -amilase e lipoxigenase, hemaglutinina, citocromo C e pela globulina conhecida como β -conglícinina. A glicinina (11S) e β -conglícinina (7S), juntas

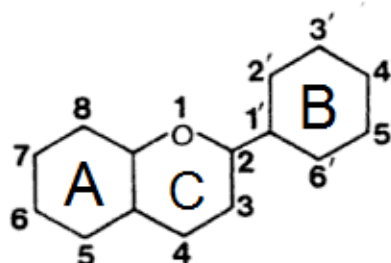
correspondem a 70% da fração protéica (MUJOO; THRIN; NG, 2002; TAY; XU; PERERA, 2005; LIU et al., 2008).

A soja contém elevado número de compostos de interesse biológico, como fitosteróis, inibidores de protease e saponinas, além das isoflavonas que apresentam estrutura similar ao estrogênio, tendo atividade estrogênica e antiestrogênica. A atividade antiestrogênica ocorre quando há excesso de estrogênio no organismo e estrogênica, quando há redução deste hormônio (MESSINA, 2006; ROSTAGNO; ARAÚJO; SANDI, 2002).

Segundo Magee e Rowland (2004), os fitoestrógenos estão associados à diminuição do risco de câncer. Esta afirmação deve-se ao fato de que os níveis plasmáticos e urinários de fitoestrógenos são mais elevados em áreas onde a incidência de câncer é baixa em comparação com as áreas onde a incidência de câncer é elevada. A variação na microbiota intestinal humana também pode estar relacionada com o risco de câncer como evidenciado pela incapacidade de alguns indivíduos produzirem fitoestrógenos ativos.

Os flavonóides pertencem ao grupo dos polifenóis, que podem ser divididos em outras 11 classes secundárias, tais como: isoflavonas, antocianinas, flavanas e flavanonas. Sua estrutura básica (Figura 1) é constituída por um núcleo flavona composto por 2 anéis benzeno (A e B) ligados por um anel heterocíclico pirano (C). Apresentam atividade antiinflamatória, antialérgica, antiosteoporótica e anticancerígena e muitos dos efeitos farmacológicos dos flavonóides estão relacionados à interação com várias enzimas e à sua atividade antioxidante (LIU, 1997; SILVA et al., 2002; DORNAS et al., 2007).

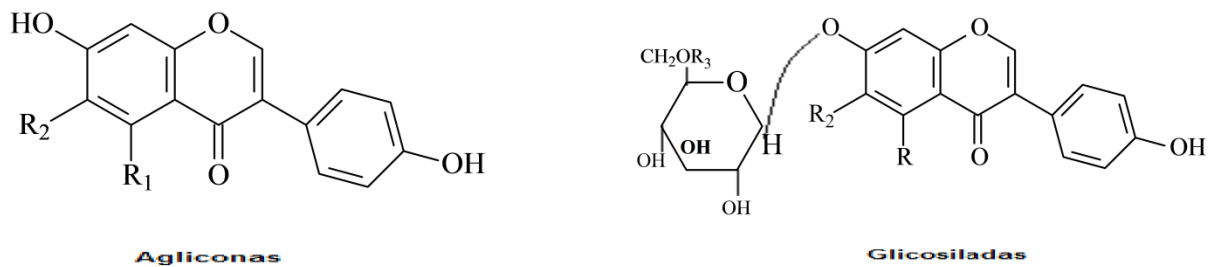
Figura 1. Estrutura geral de um flavonóide (LIU, 1997).



As isoflavonas são compostos fenólicos encontrados na soja e em seus derivados. A concentração das isoflavonas nos grãos de soja pode variar de 0,1 a 5

mg/g. Pertencem à classe dos fitoestrógenos e podem ser encontradas em 12 diferentes formas: β -glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosídicas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina), malonilglicosídica (malonildaidzina, malonilgenistina, e malonilglicitina) e em sua forma aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína) (Figura 2). Seu consumo está relacionado com a prevenção doenças como câncer de mama, cólon e problemas cardiovasculares. A forma glicosilada está presente em maior quantidade e por meio de transformações enzimáticas relacionadas ao processo digestivo, formam-se fenóis heterocíclicos que comportam-se como estrógenos (LIU, 1997; SETCHELL, 1998).

Figura 2. Estrutura química das isoflavonas encontradas na soja (LIU, 1997).



R ₁	R ₂	R ₃	Compostos
H	H	-	daidzeína
OH	H	-	genisteína
H	OCH ₃	-	Gliciteína
H	H	H	Daidzina
OH	H	H	genistina
H	OCH ₃	H	Glicitina
H	H	COCH ₃	6''-O-Acetildaidzina
OH	H	COCH ₃	6''-O-Acetilgenistina
H	OCH ₃	COCH ₃	6''-O-Acetilglicitina
H	H	COCH ₂ COOH	6''-O-Malonildaidzina
OH	H	COCH ₂ COOH	6''-O-Malonilgenistina
H	OCH ₃	COCH ₂ COOH	6''-O-Malonilglicitina

Produtos fermentados possuem de duas a três vezes mais isoflavonas agliconas que produtos não fermentados, sendo as isoflavonas agliconas absorvidas mais rapidamente que as glicosídicas e possuem atividade biológica mais acentuada (WANG; MURPHY, 1996; FUKUTAKE et al., 1996).

Além das proteínas, a soja possui elevado teor de fibras e oligossacarídeos. Os oligossacarídeos rafinose e estaquiose não são digeridos pelo sistema humano. Entretanto, são considerados prebióticos, favorecendo o crescimento de bactérias intestinais benéficas, auxiliando o sistema de defesa do organismo. A composição de lipídeos da soja é formada de ácidos graxos essenciais como o linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) que contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, aterosclerose, arritmia, etc. São fontes de vitaminas E, K, tiamina, riboflavina e ácido fólico. Apresenta bom perfil de aminoácidos, com exceção dos sulfurados como metionina, cisteína (TASHIMA; CARDELLO, 2003; CARVALHO et al., 2003; GOLBITZ; JORDAN, 2006).

3.2 SOJA PRETA

A soja preta [*Glycine max (L.) Merrill*] é uma variedade de soja que se diferencia por possuir casca escura pela presença de antocianinas, clorofila e outros pigmentos. Fonte de isoflavonas, proteínas e vitamina E. Segundo Kim et al. (2012), apesar dos cotilédones apresentarem o maior teor de compostos de interesse, a casca possui fibras, ácido fítico e compostos fenólicos.

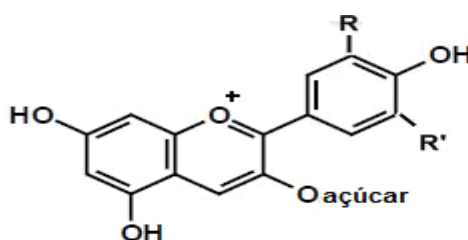
A atividade antioxidante desta soja é aumentada pela presença de antocianinas na casca. Está presente na alimentação oriental há vários anos. Estudos revelam que este alimento é benéfico à saúde, sendo consumido principalmente na forma de produtos fermentados, tofu ou extrato de soja. Takahashi et al. (2005), compararam a ação do extrato da soja amarela com o da soja preta na oxidação de LDL e encontraram que os extratos de soja preta foram mais eficientes ao retardarem a oxidação do LDL quando comparadas a variedade amarela. Extratos obtidos a partir da casca da soja preta foram significativamente mais efetivos na prevenção da oxidação do LDL do que os da variedade amarela. Entretanto não houve diferença entre os extratos produzidos a partir dos cotilédones de soja amarela e preta sem a presença da casca. Pesquisas recentes sobre a atividade antioxidante mostram que a soja preta, possui atividade inibitória contra a oxidação do LDL, apresentando forte capacidade de seqüestrar radicais DPPH (2-difenil 1-picrilhidrazil), redução do poder oxidante do ferro (FRAP) e de absorver radicais oxigênicos (ORAC), suprimindo a indução mutagênica (TAKAHASHI et al.,

2005; XU; CHANG, 2008; LEE et al., 2009; CHEN; LEE; CHOU, 2011, LEE; CHO, 2012).

Classificados como glicosídeos de antocianidinas (Figura 3), as antocianinas podem ter diferentes açúcares ligados a sua estrutura, sendo classificados como mono, di ou triglicosídeos, sendo as formas diglicosídicas e triglicosídicas mais estáveis quando comparadas as monoglicosídicas. Apresentam variação da cor de acordo com a sua forma estrutural, dependendo do valor de pH, número de hidroxilas, metoxilas e temperatura (STRINGHETA ; BOBBIO, 2000; LEE; DURST; WROLSTAD, 2005).

As antocianinas são pigmentos naturais que conferem coloração a flores, frutos e vegetais. Pertencem ao grupo dos flavonóides, não sendo sintetizados pelo corpo humano e quando ingeridos auxiliam o sistema de defesa, diminuindo a ação de radicais formados durante a respiração. Aos compostos fenólicos é atribuída a capacidade quelante de metais e inativação de radicais livres, diminuindo o risco de ocorrência de diferentes doenças. Estudos relatam o aumento significativo na quantidade de compostos fenólicos e antocianinas após processo de fermentação, estando relacionados à cultura utilizada (QIN; JIN; DONG, 2010; JENG et al., 2010).

Figura 3. Estrutura geral da antocianina (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).



Lee et al. (2009), identificaram e caracterizaram na casca da soja preta nove antocianinas, sendo estas: cianidina-catequina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-galactosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo, pelargonidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, e cianidina, ressaltando a presença em maiores quantidades para delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo, das quais a cianidina-3-glicosídeo está presente em maior quantidade.

3.3 EXTRATO DE SOJA (ES)

O ES pode ser obtido por diferentes métodos, após processo de seleção, hidratação, maceração, cocção dos grãos e centrifugação. O extrato de soja é de fácil obtenção, sendo semelhante ao leite animal, podendo ser comercializado com ou sem adição de aromatizante, não contém lactose, sendo uma alternativa aos que apresentam intolerância à lactose. Sua aceitabilidade se restringe ao sabor característico da soja, sendo que muitos compostos que contribuem para o sabor já estão presentes no grão ou são formados durante a obtenção do extrato, pela ação da temperatura ou enzimas (BENEDETTI; FALCÃO, 2003; MORAES et al., 2006) .

O ES possui características que permitem sua utilização para fermentação, servindo de substrato para o crescimento de bactérias probióticas. Por possuir os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, tidos como prébióticos, podem estimular o crescimento de probióticos de interesse. Além disso, a fermentação do ES por microorganismos, principalmente por bactérias lácticas, tem sido utilizada para melhorar o sabor e aumentar a aceitabilidade (HOU; YU; CHOU, 2000; BEASLEY; TUORILA; SARIS, 2003; BENEDETTI; FALCÃO, 2003; BLAGDEN; GILLILAND, 2005; MORAES et al., 2006; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Em média, 100 mL de extrato aquoso de soja fornece 52 calorias, 2,5% de carboidratos, 3,4% de proteínas, 2,3% de lipídios, 40 mg de cálcio, 105 mg de potássio e 1,2 mg de ferro, 40 mg de vitamina B1 e 120 mg de vitamina B2. (Embrapa, 2011).

3.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O aumento de indivíduos doentes na sociedade moderna em virtude de seu modo de vida (estresse, alimentação etc) colocam em evidência o baixo índice de doenças em determinados povos, associando a estes os benefícios oriundos de sua dieta, o que levou a pesquisas de compostos presentes na alimentação e a relação destes com os benefícios à saúde (MORAES; COLLA, 2006).

Alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que além de nutrir produzem algum efeito metabólico, sendo benéfico à saúde. Estes alimentos proporcionam benefícios quando ingeridos como parte da dieta natural, sem a necessidade de supervisão médica. O estudo e o consumo desses alimentos torna-

se cada vez mais importante, devido ao aumento significativo de pessoas que sofrem de doenças crônicas degenerativas (LAJOLO, 2005). Segundo Roberfroid (2002), para ser considerado como funcional, um alimento deve afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de apresentar efeitos nutricionais adequados, sendo relevante para o bem-estar e contribui para a redução do risco de uma doença.

O Japão foi o primeiro país a produzir e comercializar alimentos funcionais, sendo conhecidos como FOSHU (“Foods for Specified Health Use”). Estes alimentos têm selo de aprovação no Japão pelo Ministério da Saúde e Bem Estar, sendo a legislação instituída a partir de 1997. O Brasil, somente ao final do ano de 1999 passou a possuir legislação específica para estes alimentos, sendo designados como alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de Saúde (MORAES; COLLA, 2006).

No Brasil as indústrias seguem a legislação do Ministério da Saúde e quando há interesse em registrar algum alimento ou ingrediente com propriedades funcionais, o pedido é protocolado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A ANVISA tem à disposição o regulamento de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substância bioativas e probióticos. Alguns exemplos de compostos funcionais investigados são: catequinas, licopeno, flavonóides, tanino, proteínas da soja (BRASIL, 2012).

3.5 PROBIÓTICO

Segundo a Resolução RDC nº02 da ANVISA de 07 de janeiro de 2002, que define o regulamento técnico para substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, probióticos são microrganismos vivos, capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Segundo Fuller (1989), a principal razão de se utilizar probióticos na alimentação é aumentar o número e atividade de microrganismos com benefícios ao hospedeiro.

Uma bactéria, para ser considerada probiótica, deve apresentar algumas características, tais como: não ser patogênica, tóxica, mutagênica ou carcinogênica ao hospedeiro; ser preferencialmente de origem humana, isolada do trato

gastrointestinal saudável; apresentar atividade antagônica à microrganismos patogênicos, ser tolerantes à acidez do suco gástrico, resistindo aos sais biliares, enzimas e baixos níveis de oxigênio. Devem aderir às superfícies epiteliais e persistir no trato gastrointestinal humano. Entretanto, ainda não existe um consenso de quantas e quais características uma bactéria deve apresentar para ser considerada como probiótica (SAARELA et al., 2000; MATTILA SANDHOLM et al., 2002; KUMURA et al., 2004; COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2008; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Para se obter os benefícios provenientes destes microrganismos, a sua ingestão deve ser de forma regular e em quantidade suficiente (FAO/WHO, 2001; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008). Para ser considerado um alimento probiótico, este deve possuir contagem igual ou superior a 10^6 - 10^7 células viáveis por g ou mL do produto. Segundo a legislação no Brasil, as bactérias consideradas probióticas são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2012).

Os mecanismos de ação destes microrganismos envolvem síntese de substâncias e competição de nutrientes contra bactérias patogênicas, modificação do pH intestinal, aumento da secreção da mucosa, inativação de toxinas e seus receptores, estimulação a respostas imunológicas específicas ou não contra agentes patogênicos (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

Segundo Saarela et al. (2000), os microrganismos probióticos devem apresentar características tecnológicas, com boas propriedades sensoriais, mantendo-se viáveis durante o processamento e armazenamento do produto. Para Gomes e Malcata (1999) culturas probióticas contribuem na melhora do sabor do produto final, tendo uma menor capacidade de promover a acidificação durante a armazenagem pós-processamento.

3.5.1 *Lactobacillus acidophilus*

Isolado em 1900, o *Lactobacillus acidophilus* foi identificado como uma bactéria Gram positiva, não formadora de esporos, imóvel e microaerófila, com pH ótimo entre 5,5 a 6,0, com resistência ao armazenamento a temperaturas de refrigeração e apresentam-se como bastonetes longos e finos quando cultivado em meio MRS (Man, Rogosa and Sharpe) (OLIVEIRA, 1995 ; STIPP, 1996; GOMES; MALCATA, 1999). Considerada uma bactéria láctica homofermentativa, converte açúcares em ácido láctico e pequenas quantidades de compostos voláteis (LEROY; VUYST, 2004). A maioria das linhagens consegue metabolizar amigdalina, celobiose, glicose, maltose, manose, sacarose, trealose, esculina, lactose, salicina (ROBINSON, 1991), rafinose e estaquiose (WANG et al., 2003). Apresenta resistência à bile, estabelecendo-se no intestino e está associada à produção de metabólitos como peróxido de hidrogênio, ácido láctico, lactacina B, acidofilucina A, dentre outros compostos com ação contra patógenos (REQUENA; PELÁEZ, 1995).

3.5.2 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp. são caracterizadas como Gram-positivas, não esporuladas, imóveis, catalase negativas e anaeróbias. A espécie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* é moderadamente tolerante ao oxigênio (GOMES; MALCATA, 1999).

São heterofermentativas, produzindo ácido láctico e acético a partir da fermentação de açúcares como glicose, galactose, lactose e outras fontes de carbono, sendo capazes de fermentar oligossacarídeos como rafinose e estaquiose (GOMES; MALCATA, 1999). Possuem faixa de pH ótimo entre 6,0 e 7,0, tendo o crescimento reduzido em pH inferior a 4,5 e superior a 8,5, com temperatura ideal para multiplicação de 37 a 41°C (GOMES; MALCATA, 1999; SCALABRINI et al., 1998).

3.6 PETIT SUISSE

Segundo a Instrução Normativa nº 53 de 29 de dezembro de 2000, do Ministério da Agricultura e Abastecimento, que define o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo *Petit Suisse*, entende-se por queijo *petit suisse*, o queijo fresco, não maturado, obtido por coagulação do leite com coalho e/ou de enzimas específicas e/ou de bactérias específicas, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias. Surgiu em 1850, desenvolvido por Charles Chervais, onde era utilizado leite desnatado adicionado de creme, sendo este de consistência cremosa. No Brasil é destinado principalmente ao mercado infantil, tendo nos últimos anos, um grande aumento em seu consumo, apesar de ainda baixo, se comparado a outros países. Os queijos *petit suisse* nacionais, apresentam em sua constituição a presença de gomas, que auxiliam na manutenção da estabilidade e consistência do produto (MARUYAMA et al., 2006).

A produção de *petit suisse* no mercado nacional baseia-se em centrifugação para a separação da massa, sendo esta denominada de queijo tipo quark, pertencendo este ao grupo de queijos frescos, acidificados, não maturados, consumidos logo após a produção, sendo mantidos sob refrigeração. Posteriormente este queijo passa por outros processos, sendo misturado a outros ingredientes como açúcares e frutas, caracterizando o *petit suisse*. Em países europeus a produção ocorre por meio de métodos e equipamentos avançados, sendo encontrado também sob a forma aerada, onde ocorre a adição de leite batido, açúcar, aromatizantes e estabilizantes (VEIGA; VIOTTO, 2001).

Considerando a importância da soja na saúde humana, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um queijo tipo *petit suisse* a partir de extrato de soja preta fermentado com cultura probiótica e avaliar as características físicas, químicas e sensoriais deste produto e comparar com as características do grão, extrato de soja com e sem casca e quark.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Soja Preta

Para elaboração do EASP (extrato aquoso de soja preta) foi utilizada soja preta em grãos [*Glycine max (L.) Merrill*], adquirida no comércio da cidade de Londrina-PR, cultivada na cidade de Uraí-PR, safra 2011.

4.1.2 Cultura Probiótica

Foi utilizada cultura de iogurte destinada a produtos de soja, composta por linhagens de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* produtores de exopolissacarídeos (EPS). A cultura foi fornecida pela empresa Clerici-Sacco[®], Itália, sob denominação comercial de Lyofast SYAB 1.

4.1.3 Polpa de Amora Preta

Foi utilizada polpa de amora preta (*Morus nigra*) adquirida no comércio local de Londrina-PR, Ricaeli Ltda. São Paulo, Brasil.

4.2 MÉTODOS

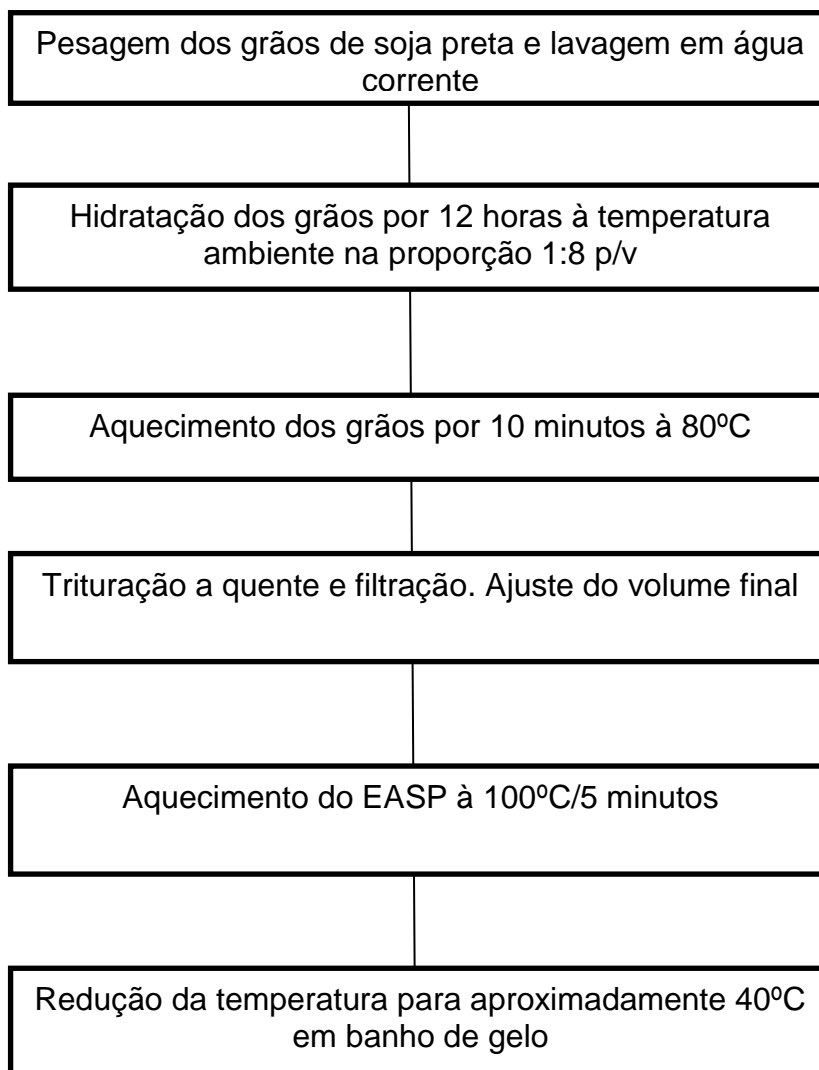
4.2.1 Preparo dos Inóculos

A cultura probiótica liofilizada foi reativada em 1 litro de extrato de soja (EAS) estéril, sendo dividido em porções de 10 mL e congelado para posterior uso na elaboração do produto fermentado.

4.2.2 Obtenção do ESP (Extrato de Soja Preta).

O ESP foi obtido, adaptando-se as metodologias descritas por Prudêncio e Benedet (1999) e Boatto et al. (2010), com algumas modificações (figura 4).

Figura 4. Fluxograma para obtenção do ESP

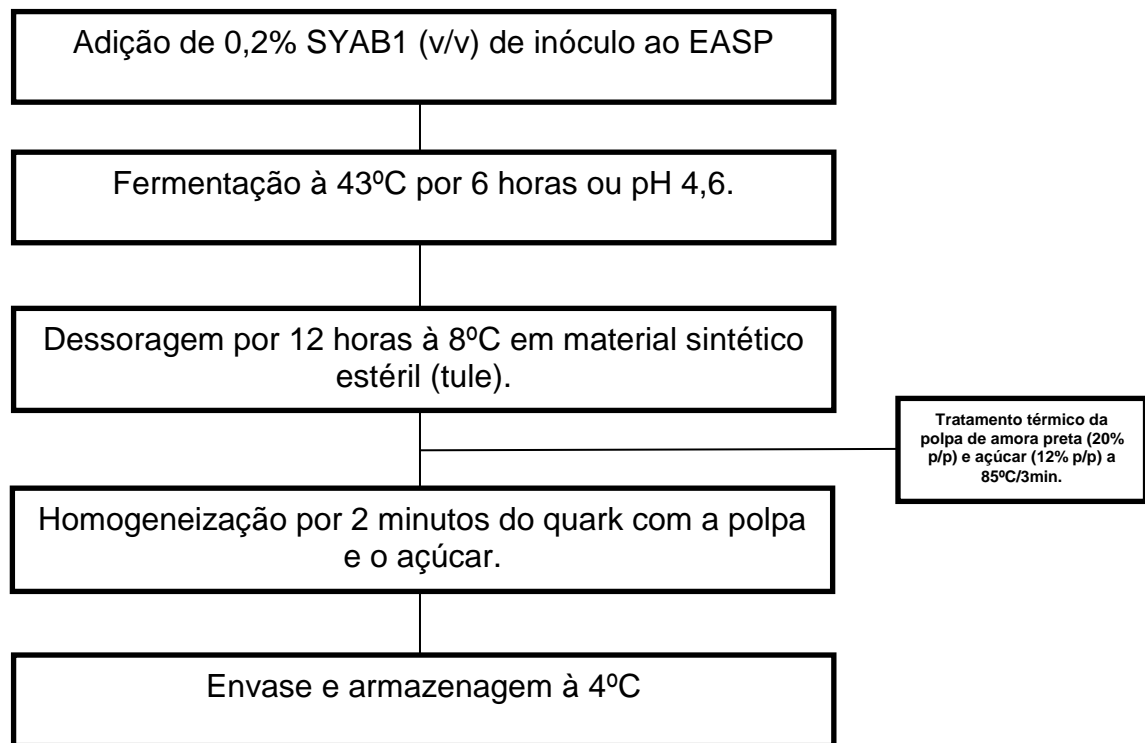


4.2.3 Preparo do Queijo Tipo Petit Suisse de Soja Preta

O queijo tipo *petit suisse* de soja preta foi preparado com base na metodologia descrita por Maruyama et al. (2006) e Boatto et al. (2010), conforme a Figura 5. O inóculo foi adicionado ao ESP e esfriado à aproximadamente 40°C na

proporção de 0,2% (v/v) da cultura SYAB 1, previamente descongelado à temperatura ambiente. O ESP foi colocado em recipientes com a tampa semi-aberta e fermentado por 6 horas a 43°C ou até pH 4,6. Após essa etapa, utilizando material sintético (tule) esterilizado, o ESPF foi dessorado por 12 horas a temperatura de 8°C para obtenção da massa base, denominada de Quark. Por fim foi adicionada polpa de amora (20% p/p) e açúcar (12% p/p), previamente tratados termicamente (85°C/3 minutos) para posterior homogeneização com o quark. A quantidade de açúcar foi escolhida por meio de teste sensorial escala-do-ideal.

Figura 5. Fluxograma para obtenção do *petit suisse* sabor amora.



4.2.4 Determinação e quantificação de Isoflavonas por *CLUAE* (cromatografia líquida de ultra eficiência).

Os extratos para quantificação de isoflavonas foram obtidos segundo Carrão-Panizzi, Favonni, Kikuchi (2002) e Yoshiara et al. (2012). As amostras liofilizadas (Christ Alpha 2-4 LD plus, Osterode am Harz, Alemanha) foram desengorduradas utilizando hexano na proporção 1:10 (p/v) por 60 minutos a temperatura ambiente

sob agitação. Para extração utilizou-se 300 mg da amostra juntamente com 6 mL de solvente extrator composto por água, etanol e acetona (1:1:1 v/v/v), agitando a cada 15 minutos por 1 hora a temperatura ambiente, seguindo para banho ultrassônico por 15 min, centrifugando (Centrifuge 5804R – Eppendorf, Hamburg, GE) a 80000 x g a 4°C, filtrando os sobrenadantes em filtros Millex – LH (0,20 µm).

As condições cromatográficas utilizadas para a separação e quantificação de isoflavonas foram coluna de fase reversa modelo Acquity UPLC BEH C18 (Waters, 2,1 mm x 50 mm, partículas de 1,7 µm), em cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência da marca Waters, modelo Acquity e injetor automático de amostras. Para a separação, utilizou-se sistema gradiente binário com fase inicial de 90% de H₂O acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e 10% de acetonitrila. Após 8 minutos de eluição foi atingida uma proporção de 0% H₂O e 100% acetonitrila, retornando aos 9 minutos para as condições iniciais, com um tempo total de corrida de 10 minutos. A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL min⁻¹ a temperatura de 35°C. Para a detecção, é utilizado o detector de arranjo de diodos da marca Waters ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. A identificação das isoflavonas foi realizada por comparação com curvas individuais de padrão de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína, acetil-daidzina, acetil-glicitina e acetil genistina (Sigma-Aldrich). A concentração de isoflavonas malonilglicosídicas foi calculada a partir das curvas padrões dos seus correspondentes β-glicosídicos utilizando a similaridade do coeficiente de extinção (Coward et al., 1998). A quantificação por padronização externa é feita utilizando como referência as curvas dos padrões, sendo expressos em mg/100g em base seca.

4.2.5 Avaliação da Composição centesimal

A avaliação da composição centesimal foi realizada em três períodos (1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4°C) para: grão integral, ESP, ESP s/c (sem casca), quark e *petit suisse*, seguindo as metodologias descritas pela AOAC (2006).

Foram determinados os teores proteínas, lipídios, cinzas e umidade. Os carboidratos foram obtidos por diferença.

4.2.6 pH

O pH das amostras: ESP, ESPF, ESP s/c, quark e *petit suisse*, foi determinado nos intervalos de 1, 15 e 30 dias de armazenamento à 4°C, utilizando-se potenciômetro digital (Hanna, HI 223).

4.2.7 Determinação de Acidez Titulável

Para a determinação da acidez das amostras: ESP, ESPF, ESP s/c, quark e *petit suisse*, com 1, 15 e 30 dias de armazenamento à 4°C, utilizou-se o método do Instituto Adolfo Lutz (2008), por meio de titulação com NaOH 0,1M. O resultado foi expresso em g de ácido láctico.100 g⁻¹. Em função da coloração e turbidez das amostras, utilizou-se o método potenciométrico, com potenciômetro digital (Hanna, HI 223).

4.2.8 Capacidade de Retenção de Água.

Para a determinação da capacidade de retenção de água das amostras de quark e *petit suisse*, foi utilizada metodologia descrita por Ozer et al. (1998), onde 20 g da amostra foi submetida a centrifugação (HITACHI Hoki Co. Ltd, CR21, Japão) a 13.500(x g) por 30 min a 10°C. Após esta etapa, o soro liberado foi coletado e pesado. A capacidade de retenção de água foi expressa em % (p/p).

4.2.9 Viscosidade

A viscosidade foi determinada seguindo a metodologia proposta por Baú (2012) para as amostras de quark e *petit suisse* utilizando Viscosímetro digital *Brookfield*, com *spindle* 4, velocidade de 12 rpm a partir de 600 mL de amostra acondicionada em béquer e mantida à temperatura de refrigeração por 12 h após homogeneização.

4.2.10 Contagem de Bactérias Lácticas Totais

A contagem de bactérias lácticas totais foi realizada para o *petit suisse* em 1,15 e 30 dias de armazenagem a 4°C, utilizando meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe, HiMEDIA laboratories, Mumbai, Índia), sendo plaqueadas em profundidade e incubadas em aerobiose a 37°C por 72 h (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999).

4.2.11 Contagem Diferencial de *Lactobacillus acidophilus*

A contagem diferencial de *Lactobacillus acidophilus* foi realizada para o *petit suisse* em 1,15 e 30 dias de armazenagem a 4°C, utilizando meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe, HiMEDIA laboratories, Mumbai, Índia) suplementado com bile bovina (0,15% p/v, Laboratórios DIFCO Ltda), sendo plaqueadas em profundidade e incubadas em aerobiose a 37°C por 72 h (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000).

4.2.12 Contagem Diferencial de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*

A contagem diferencial de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* foi realizada para o *petit suisse* em 1,15 e 30 dias de armazenagem a 4°C, utilizando meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe, HiMEDIA laboratories, Mumbai, Índia) suplementado com cloreto de lítio (0,2% p/v, VETEC Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e propionato de sódio (0,3% p/v, SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) sendo plaqueadas em profundidade e incubadas em anaerobiose com anaerobac (Produtos Bacteriológicos Ltda, São Paulo, Brasil) a 37°C por 72 h (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000).

4.2.13 Atividade da Enzima β -Glicosidase

A extração foi realizada segundo metodologia de descrita por Carrão-Panizzi e Bordignon (2000), utilizando 0,1 g da amostra liofilizada e 1,5 mL de tampão fosfato citrato 0,05M (pH 4,5) contendo 0,1 M de cloreto de sódio, mantendo por 1 h à temperatura ambiente, agitando a cada 15 minutos as amostras. Decorrido 1 h, as amostras foram centrifugadas (HITACHI Hoki Co. Ltd, CR21, Japão) por 15 minutos a 5°C.

A atividade da β -glicosidase foi monitorada utilizando o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG, SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) em concentração de 1 mM segundo Matsuura e Obata (1993). Para estimar a atividade hidrolítica da enzima (p-NPG 1mM em tampão fosfato citrato 0,1M, pH 5,0), utilizou-se 0,5 mL do extrato da amostra juntamente com 2 mL do substrato p-NPG, permanecendo à 30°C por 30 minutos em banho. Para interromper a reação 2,5 ml de carbonato de sódio 0,5M foi adicionado. A coloração amarela resultante da reação foi medida em espectrofotômetro UV-visível, modelo Libra S22 (Biochrom®, Reino Unido) a 420 nm. A atividade enzimática dos extratos foi determinada por meio de curva com padrão de p-nitrofenol (p-NP, SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) em concentrações de 16 a 128 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Uma unidade de atividade de enzima (UA) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de p-NP por minuto. Os resultados foram expressos como atividade de β -glicosidase por grama (UA/g).

4.2.14 Determinação de Compostos Fenólicos Totais.

Para extração dos compostos fenólicos totais foi utilizada metodologia descrita por Adom e Liu (2002) e Hung et al. (2009), onde 1 g de amostra liofilizada foi adicionada a etanol 80% na proporção 1:10, sendo agitadas por 20 minutos a 200 rpm (MARCONI, MA 140/CFT, São Paulo, Brasil). As amostras seguiram para centrifugação (HARRIER, Reino Unido) a 2000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante coletado. A etapa de extração foi repetida mais duas vezes, sendo os extratos concentrados para 10 mL em rotaevaporador (MARCONI MA 120, São Paulo, Brasil) à 50°C, completando após este período o volume para 10 ml com etanol 80% caso fosse necessário. Os extratos foram armazenados a -22°C até a utilização. Para determinação de compostos fenólicos totais, utilizou-se a metodologia descrita por Swain e Hills (1959), com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%, 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5% e 0,5 mL dos extratos das amostras, sendo incubada por 5 minutos a 50°C. Após este período realizou-se leitura em espectrofotômetro UV-visível, modelo Libra S22 (Biochrom®, Reino Unido) a 760nm, tendo sido utilizado como branco a solução de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. A quantificação foi feita pela curva padrão de ácido gálico (0,1 a

0,5 mM) e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico/100 g (EAG) em base seca.

4.2.15 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais DPPH[•]

A capacidade de sequestrar radicais DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrihidrazil; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) foi realizada segundo Brand-Williamns, Cuvelier, Berset (1995), onde 50 µL dos extratos das amostras foram adicionados a 1 ml de tampão acetato (100 mM, pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de solução de DPPH[•] 250 µM, sendo armazenada no escuro por 30 minutos, seguindo para leitura em espectrofotômetro UV-visível, modelo Libra S22 (Biochrom®, Reino Unido) a 517 nm. Para a quantificação dos extratos utilizou-se curva padrão de Trolox (100 a 1000 µM; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), sendo os resultados expressos em µmol de Trolox/g de amostra em base seca.

4.2.16 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radical Livre ABTS^{•+}

A capacidade de sequestrar o cátion radical livre ABTS^{•+} (2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) foi realizada utilizando a metodologia descrita por Sanches-Gonzales, Jimenez-Escrig, Saura-Calixto (2005). Para análise foi preparada solução ABTS 7mM e persulfato de potássio (LABSYNTH, São Paulo, Brasil) 2,45 mM. Aproximadamente 16 horas antes da análise em ambiente escuro, foram adicionados para reagir 5 mL da solução de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (2,45 mM). Esta solução foi diluída com etanol absoluto até apresentar absorvância $0,700 \pm 0,020$ a 730 nm. Por fim adicionou-se 30 µL da amostra a 3 mL da solução diluída de ABTS^{•+}. Após 6 minutos de reação foi lida a absorvância das amostras em espectrofotômetro UV-visível, modelo Libra S22 (Biochrom®, Reino Unido) a 730 nm. A quantificação foi feita com base na curva padrão de Trolox (100 a 2000 µM; SIGMA Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha), sendo os resultados expressos em µmol de Trolox/ g de amostra em base seca.

4.2.17 Antocianinas Totais e Monoméricas

O teor de antocianinas totais (AT) e monoméricas (AM) foi determinado segundo metodologia descrita por Giusti; Wrolstad (2001). Para antocianinas totais, 1 g de amostra foi colocado com 50 mL de solução de cloreto de potássio 0,025 M pH 1, sendo agitado e deixado em repouso por 25 minutos em ambiente escuro. Em seguida, as amostras foram filtradas e lidas em espectrofotômetro UV-visível, modelo Libra S22 (Biochrom®, Reino Unido) a 510 e 700 nm. O cálculo para AT encontra-se a seguir.

$$AT = \frac{(A_{510} - A_{700})_{pH1} \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon}$$

A = Absorvância a 510 e 700 nm

PM = massa molecular Cianidina-3-O-glicosídeo (449,2 g/mol)

FD = Fator de diluição

ϵ = Coeficiente de extinção Molar (26.900)

Para AM, 1 g da amostra foi colocado com 50 mL de solução de acetato de sódio 0,4M, pH 4,5 sendo agitado e deixado em repouso por 25 minutos em ambiente escuro. Em seguida filtraram-se as amostras e os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro UV-visível, modelo Libra S22 (Biochrom®, Reino Unido) à 510 e 700 nm. O calculo para AM foi feito conforme a equação:

$$AM = \frac{(A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5} \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon}$$

A = Absorvância a 510 e 700 nm

PM = massa molecular de Cianidina-3-O-glicosídeo (449,2 g/mol)

FD = Fator de diluição

ϵ = Coeficiente de extinção Molar (26.900)

4.2.18 Medida de Cor

As amostras ESP s/c, ESP, ESPF, quark e *petit suisse* armazenadas a 4°C por 1, 15 e 30 dias foram avaliadas quanto à cor, utilizando colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc.) com iluminante D65. Os valores de L*(luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema CIELAB (Caldeira et al., 2010).

4.2.19 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata genuína, sendo aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparação de médias no nível de 5% de significância.

4.2.20 Análise das Condições Higiênico-Sanitárias

As análises microbiológicas dos produtos fermentados com a cultura probiótica foram realizadas em triplicata, como critério higiênico-sanitário para posterior submissão das amostras à análise sensorial.

Foram considerados os padrões microbiológicos exigidos para leites fermentados, com ou sem adições, refrigerado e com bactérias lácticas viáveis nos padrões segundo a RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001.

4.2.21 Análise Sensorial

Para a realização da análise sensorial o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Processo 27238/2011, Anexo 1) da Universidade Estadual de Londrina e aprovado.

A avaliação sensorial de queijo tipo *petit suisse* a partir de extrato aquoso de soja preta, fermentado com cultura probiótica adicionado de polpa de fruta (amora) foi realizada em cabines individuais, com luz branca. As amostras foram servidas em quantidades padronizadas (aproximadamente 20g), refrigeradas 10±2°C, codificadas com números aleatórios. Para todas as amostras foi assegurada a inocuidade,

sendo fornecidas apenas após a garantia de ausência de patógenos. A cultura probiótica era composta de linhagens comerciais, sendo utilizadas por indústrias de alimentos.

A análise sensorial foi realizada em duas etapas, sendo a primeira realizada para definir a doçura do produto. As amostras contendo diferentes concentrações de açúcar foram avaliadas em relação à doçura segundo Instituto Adolfo Lutz (2008) pelo teste escala-do-ideal. O teste contou com uma equipe não treinada de 40 provadores. As amostras foram apresentadas, codificadas, cabendo aos provadores avaliar a intensidade do atributo, respondendo qual apresenta a intensidade ideal, conforme a ficha de avaliação apresentada na Figura 6. Após definida a melhor concentração de açúcar, o produto passou pela Análise de aceitação (Instituto Adolfo Lutz, 2008). O produto foi avaliado 65 provadores em relação ao aroma, sabor, impressão global, cor e textura, utilizando escala hedônica de 9 pontos (Figura 7).

Todos os participantes foram devidamente esclarecidos, sendo coletado termo de consentimento livre para sua participação (Anexo 2 e 3).

4.2.22 Teste Sensorial Escala-do-Ideal

Para o teste participaram 40 provadores não treinados, dos quais 6 eram homens e 34 mulheres, com idades variando entre 20 a 60 anos, onde 70% dos provadores afirmaram consumir produtos derivados de soja e 67,5% alegaram consumir produtos fermentados com alegações de probióticos (MARCELINNI, CHAINHO; BOLINI, 2005).

Figura 6. Modelo de ficha para teste sensorial escala-do-ideal.

TESTE DE ESCALA DO IDEAL

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo amostras de queijo tipo *petit suisse* probiótico sabor amora produzido a partir de extrato aquoso de soja preta. Por favor, avalie as amostras com relação à intensidade de doçura, marcando para cada amostra qual intensidade se adequa de acordo com seu paladar.

Doçura: Escala do ideal		
	Amostra X	Amostra Y
Muito abaixo		
Pouco abaixo		
Ideal		
Pouco acima		
Muito acima		

Figura 7. Modelo de ficha para teste de aceitação sensorial com escala hedônica estruturada em 9 pontos

TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de queijo tipo *petit suisse* probiótico sabor amora produzido a partir de extrato aquoso de soja preta. Por favor, avalie a amostra com relação aos atributos cor, sabor, textura, aroma e aceitação global, segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo:

- (9) gostei extremamente
- (8) gostei moderadamente
- (7) gostei regularmente
- (6) gostei ligeiramente
- (5) não gostei, nem desgostei.
- (4) desgostei ligeiramente
- (3) desgostei regularmente
- (2) desgostei moderadamente
- (1) desgostei extremamente

AMOSTRA	COR	SABOR	TEXTURA	AROMA	ACEITAÇÃO GLOBAL

Comentários: _____

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Na Tabela 1 podem ser observados os valores encontrados para as amostras durante o período de armazenagem por 1, 15 e 30 dias à 4°C. A composição permaneceu estável ao longo dos 30 dias de armazenamento a 4°C para todas as amostras. O grão de soja preta apresentou os maiores teores de proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos, sendo que os valores obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura. Em trabalho publicado por Lin e Lai (2006), valores semelhantes foram observados para composição química de soja preta em grãos, tendo em média 9,3% de umidade, 14,5% de lipídeos, 5,45% cinzas e 41,50% proteínas.

Tabela 1. Composição Química do Grão de Soja Preta, EASP, EASP S/C, Quark e *Petit Suisse* com 1, 15 e 30 dias de armazenagem à 4°C.

Amostra	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos	Cinzas	Umidade
Grão 1	40,99 ^a ± 0,76	26,72 ^a ± 0,19	18,85 ^a ± 0,40	4,64 ^a ± 0,08	8,79 ^d ± 0,38
Grão 15	40,37 ^a ± 0,63	27,22 ^a ± 0,75	18,88 ^a ± 0,24	4,74 ^a ± 0,07	8,75 ^d ± 0,12
Grão 30	40,21 ^a ± 0,20	27,64 ^a ± 0,38	18,79 ^a ± 0,19	4,71 ^a ± 0,04	8,64 ^d ± 0,21
EASP 1	2,23 ^c ± 0,04	1,00 ^d ± 0,30	0,87 ^c ± 0,07	0,24 ^c ± 0,01	95,64 ^a ± 0,25
EASP 15	2,30 ^c ± 0,03	1,09 ^d ± 0,02	0,84 ^c ± 0,03	0,24 ^c ± 0,01	95,52 ^a ± 0,04
EASP 30	2,22 ^c ± 0,01	1,07 ^d ± 0,10	0,89 ^c ± 0,04	0,25 ^c ± 0,01	95,56 ^a ± 0,16
EASP S/C 1	2,25 ^c ± 0,03	1,21 ^d ± 0,15	0,83 ^c ± 0,01	0,25 ^c ± 0,01	95,44 ^a ± 0,11
EASP S/C 15	2,24 ^c ± 0,03	1,13 ^d ± 0,1	0,84 ^c ± 0,02	0,25 ^c ± 0,00	95,53 ^a ± 0,04
EASP S/C 30	2,27 ^c ± 0,04	1,09 ^d ± 0,13	0,84 ^c ± 0,02	0,25 ^c ± 0,02	95,53 ^a ± 0,07
Quark 1	6,35 ^b ± 0,13	2,72 ^c ± 0,61	3,61 ^b ± 0,08	0,41 ^b ± 0,00	86,88 ^b ± 0,39
Quark 15	6,26 ^b ± 0,17	2,51 ^c ± 0,44	3,56 ^b ± 0,06	0,39 ^b ± 0,01	87,28 ^b ± 0,39
Quark 30	6,03 ^b ± 0,07	2,39 ^c ± 0,30	3,66 ^b ± 0,08	0,40 ^b ± 0,01	87,50 ^b ± 0,16
Petit 1	6,63 ^b ± 0,15	11,17 ^b ± 0,39	3,57 ^b ± 0,14	0,40 ^b ± 0,00	78,36 ^c ± 0,46
Petit 15	6,57 ^b ± 0,08	11,05 ^b ± 0,12	3,52 ^b ± 0,11	0,40 ^b ± 0,01	78,44 ^c ± 0,12
Petit 30	6,45 ^b ± 0,11	11,32 ^b ± 0,26	3,56 ^b ± 0,07	0,40 ^b ± 0,00	78,25 ^c ± 0,19

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si no nível de 5% de significância.

EASP: extrato aquoso de soja preta; EASP S/C: extrato aquoso de soja preta sem casca.

A etapa de dessoragem foi importante durante o processamento, pois reduziu o teor de umidade ao passo que aumentou os demais componentes. Conforme mostra a Tabela 1, o quark e o *petit suisse* apresentaram teores similares para proteínas, lipídeos e cinzas, não diferindo no nível de 5% de significância. Estes valores foram significativamente superiores aos apresentados pelo extrato aquoso com e sem a presença da casca. Em relação ao teor de carboidratos, o *petit suisse* diferiu significativamente no nível de 5% de significância do quark, ESP e ESP S/C.

O aumento no teor de carboidratos foi em virtude da adição do açúcar ao produto final.

Resultados similares foram observados por Boatto et al. (2010) na produção de queijo tipo *petit suisse* de soja enriquecido com cálcio, com composição química em média 5% de proteína total, 0,35% cinzas e 3,59% para lipídeos.

5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ISOFLAVONAS POR CLUAE

Por constituírem frações importantes sob o ponto de vista funcional, foram quantificados os teores de isoflavonas totais e as respectivas concentrações das frações β -glicosídicas, malonil-glicosídicas e agliconas nos grãos, extratos e produto desenvolvido, assim como atividade específica da enzima β -glicosidase ao longo do armazenamento refrigerado a 4°C (Tabela 2).

Dentre as amostras, o extrato aquoso de soja preta apresentou os maiores teores de isoflavonas totais em base seca, não diferindo estatisticamente entre si ao longo do armazenamento ($p < 0,05$). Os valores observados para o extrato aquoso de soja preta são similares aos encontrados por Goés-Favoni et al. (2004) que caracterizaram isoflavonas em produtos comerciais de soja, dentre os quais, extratos aquosos de soja comerciais em pó. As amostras de *petit suisse* apresentaram o menor teor de isoflavonas totais dentre todas as amostras, existindo diferença significativa ($p < 0,05$). Esta menor concentração de isoflavonas é consequência da adição de outros ingredientes, como polpa de amora e açúcar, que ocasionou uma diluição e diminuição das isoflavonas totais no produto (cerca de 25%) comparada ao quark. Característica similar foi encontrada por Rossi et al. (2004), onde os autores determinaram a quantidade de isoflavonas nas diferentes etapas do processamento de “iogurte” de soja, encontrando uma redução de aproximadamente 27% do teor de isoflavonas totais em virtude a adição de outros ingredientes.

Tabela 2. Atividade β -glicosidase, Identificação e Quantificação de isoflavonas com 1, 15 e 30 dias de armazenagem a 4°C para Grãos, ESP, Quark e *Petit Suisse* (base seca).

Amostras	UA/g*	Daidzina	Genistina	Malonil Daidzina	Malonil Genistina	Daidzeína	Genisteína	Total
Grão 1	0,1373 ^a ± 0,0014	13,74 ^f ± 0,79	11,71 ^e ± 1,00	26,16 ^b ± 0,79	25,60 ^b ± 1,52	nd	5,86 ^g ± 0,58	83,09 ^c ± 4,13
Grão 15	0,1370 ^a ± 0,0024	14,75 ^{e,f} ± 0,70	12,62 ^e ± 1,43	25,24 ^b ± 1,79	25,46 ^b ± 1,44	nd	6,43 ^g ± 0,38	83,73 ^c ± 6,57
Grão 30	0,1394 ^a ± 0,0012	14,04 ^{e,f} ± 0,72	12,39 ^e ± 0,81	25,00 ^b ± 0,45	26,19 ^{a,b} ± 1,19	nd	6,09 ^g ± 0,35	84,18 ^c ± 3,23
ESP 1	0,0694 ^b ± 0,0008	24,66 ^b ± 0,77	18,91 ^{b,c} ± 0,54	29,31 ^a ± 0,19	28,57 ^a ± 0,62	nd	6,97 ^g ± 0,30	107,73 ^a ± 2,01
ESP 15	0,0690 ^b ± 0,0010	29,47 ^a ± 0,28	22,32 ^a ± 0,40	23,98 ^b ± 0,18	22,78 ^c ± 0,16	nd	12,36 ^d ± 0,17	108,82 ^a ± 0,77
ESP 30	0,0690 ^b ± 0,0022	23,81 ^b ± 0,33	5,68 ^f ± 0,34	17,78 ^{d,e} ± 0,60	13,47 ^e ± 0,30	8,43 ^a ± 0,11	40,08 ^a ± 0,59	109,28 ^a ± 0,65
Quark 1	0,0653 ^b ± 0,0006	18,33 ^d ± 0,36	18,43 ^c ± 0,55	21,07 ^c ± 0,25	27,27 ^{a,b} ± 0,29	nd	12,13 ^d ± 0,26	95,86 ^b ± 0,55
Quark 15	0,0661 ^b ± 0,0015	20,45 ^c ± 0,62	19,43 ^{b,c} ± 0,25	18,83 ^d ± 0,56	22,96 ^c ± 0,55	nd	14,23 ^c ± 0,11	95,82 ^b ± 0,36
Quark 30	0,0663 ^b ± 0,0018	21,79 ^c ± 0,56	20,61 ^{a,b} ± 0,62	16,22 ^e ± 0,29	17,84 ^d ± 0,44	3,87 ^b ± 0,06	17,27 ^b ± 0,24	96,75 ^b ± 0,53
Petit 1	0,0454 ^c ± 0,0009	10,88 ^g ± 0,54	11,52 ^e ± 0,49	13,74 ^f ± 0,62	17,97 ^d ± 0,76	nd	7,90 ^{e,f} ± 0,42	62,04 ^d ± 2,87
Petit 15	0,0462 ^c ± 0,0001	13,08 ^f ± 0,85	13,28 ^{d,e} ± 0,79	11,78 ^f ± 0,68	16,20 ^d ± 0,85	nd	8,06 ^{e,f} ± 0,40	62,42 ^d ± 3,62
Petit 30	0,0468 ^c ± 0,0015	15,80 ^e ± 0,44	15,01 ^d ± 0,62	9,66 ^g ± 0,26	13,08 ^e ± 0,45	1,34 ^c ± 0,10	8,40 ^e ± 0,40	63,32 ^d ± 1,59

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si no nível de 5% de significância.

ESP: extrato aquoso de soja preta; *Petit suisse*: quark com 20% de polpa de amora.

*UA: unidade de atividade (UA/g)

nd: não detectado

Os valores de isoflavonas totais encontrados para o grão integral de soja preta, aproximadamente 80mg/100g em base seca, são similares aos encontrados na literatura para soja amarela. Segundo Carrão-Panizzi et al. (2009), os teores encontrados nos grãos de soja são estritamente relacionados a fatores genéticos e ambientais. Em trabalho realizado por Silva et al. (2012), os teores de isoflavonas quantificados em diferentes cultivares de soja amarela variaram de 150 à 330 mg/100g de soja (b. s.). Já Rossi et al. (2004), encontraram 66 mg/100g para o grão integral de isoflavonas totais em base úmida.

Segundo Barnes (1998), aproximadamente 60% das isoflavonas totais encontradas no grão integral de soja preta correspondem às formas malonil.

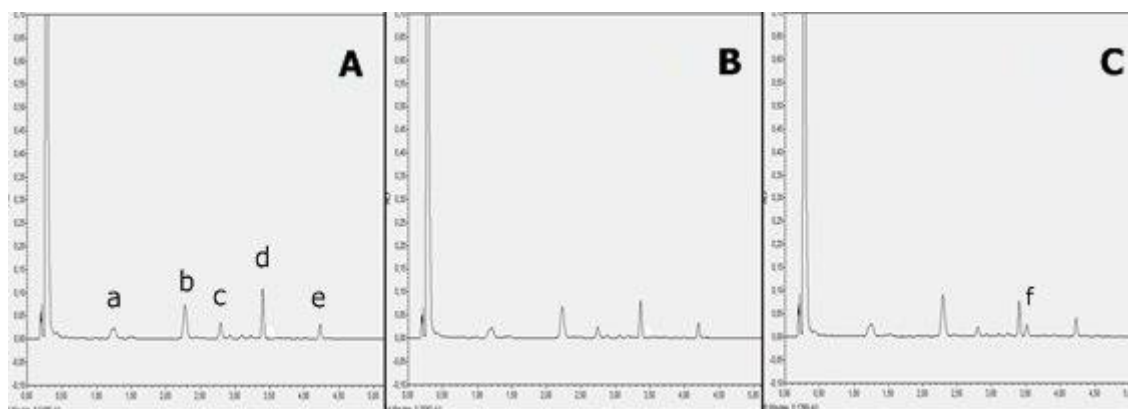
O teor de isoflavonas nas formas malonil, β -glicosídicas e agliconas nos grãos de soja preta permaneceram estáveis não havendo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento (Tabela 2). Isto se deve à baixa umidade apresentada pelo grão, o que dificulta e diminui a ação da enzima β -glicosidase. Em trabalho realizado por Araujo, Carlos e Sedyama (1997) observou-se um aumento significativo nos teores de isoflavonas agliconas em soja foi hidratada.

Para as amostras (ESP, Quark e Petit), houve diferença significativa no perfil de isoflavonas durante o armazenamento. O ESP apresentou um aumento de 5,7 vezes no teor de isoflavona aglicona genisteína em 30 dias de armazenamento à 4°C. No 1º dia, o teor de isoflavonas agliconas correspondiam a aproximadamente 7% do teor de isoflavonas total e 45% após 30 dias de armazenagem. Este aumento no teor de agliconas pode ser resultado da ação residual da enzima β -glicosidase (Tabela 2). Segundo Araujo, Carlos, Sedyama (1997), a β -glicosidase do grão da soja possui valor de pH ótimo entre 5,2-6,0, valores próximos ao apresentados pelo ESP (Tabela 4). Ainda segundo os autores, a enzima possui pl entre 4,2-4,4 com uma temperatura ótima para hidrólise a 50°C. Em trabalho realizado por Carrão-Panizzi, Simão e Kikuchi (2003) foi observado um aumento significativo de 13,5 vezes no teor de isoflavonas agliconas em grãos de soja com tratamento hidrotérmico a 50°C por 12 h. Na presença de uma menor temperatura é necessário um maior tempo de exposição para a ação da enzima.

Observando os resultados apresentados para o Quark e *Petit suisse* na Tabela 2, verifica-se que estas amostras apresentaram teores iniciais significativamente maiores de isoflavonas agliconas em relação ao grão e ESP.

Entretanto somente o quark apresentou aumento progressivo e significativo ($p < 0,05$) com o armazenamento (Figura 8). Esse incremento inicial (1^o dia) provavelmente foi em consequência do processo de fermentação (6 horas/43°C), bem como pela etapa de dessoragem, uma vez que isoflavonas agliconas são menos solúveis em água que as formas glicosiladas, pois a glicose presente nas formas glicosiladas contribui para aumentar sua solubilidade (LIU et al., 2003). Segundo Otieno, Ashton e Shah (2005), produtos fermentados de soja tendem a possuir maiores teores de isoflavonas agliconas, devido à presença de microrganismos produtores da enzima β -glicosidase. Donkor e Shah (2008) pesquisaram a hidrólise de isoflavonas em ESF (extrato de soja fermentado) pela β -glicosidase produzida por *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis subsp. lactis* e observaram que a atividade de β -glicosidase está correlacionada a cada micro-organismo, sendo função do crescimento microbiano e do tempo de fermentação. Após 6 horas de fermentação, houve aumento significativo de 63 e 77% nos teores de isoflavonas agliconas, sendo este aumento contínuo até 36 horas a 37°C para o *Lactobacillus acidophilus* e 24 horas para a *Bifidobacterium lactis*.

Figura 8. Perfil cromatográfico de isoflavonas por UPLC: Quark 1 dia (A), Quark 15 dias (B) e Quark 30 dias (C). a: daidzina, b: genistina, c: Malonil-daidzina, d: malonil-genistina, e: genisteína, f: daidzeína



Para esta pesquisa a fermentação do ESP foi conduzida com cultura comercial mista, com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* à 43°C por 6 horas.

As condições de produção e armazenamento exerceram influência nos teores de isoflavonas agliconas no quark e *petit suisse*. Inicialmente os teores de agliconas no quark e *petit suisse* foram de aproximadamente 12% e 13% das isoflavonas totais e após 30 dias de armazenamento a 4°C aumentaram para 22% e 15% de isoflavonas totais. O aumento no teor de isoflavonas agliconas no quark foi significativo, enquanto que no *petit suisse* não. Provavelmente isto seja resultado dos valores de pH (Tabela 4), uma vez que no caso do *petit suisse* o valor baixo de pH pode ter prejudicado a transformação em agliconas, associado ao fato de as amostras de *petit suisse* apresentarem a menor atividade da enzima β -glicosidase.

5.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Na Tabela 3 observa-se que o ESP apresentou teores superiores de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e monoméricas em relação à grãos, quark e *petit suisse*. O teor de compostos fenólicos totais do ESP foi 42% superior ao ESP s/c, uma vez que as antocianinas e outros flavonoides estão presentes na casca.

Bolanho e Beléia (2011) pesquisaram compostos bioativos e atividade antioxidante em derivados de soja. Para o grão de soja BRS 267 o teor de compostos fenólicos totais foi de 187,8 mg EAG/100g em base seca, sendo inferior ao encontrado para a soja preta utilizada neste trabalho. Essa diferença deve-se principalmente pela presença de antocianinas na casca da soja preta, aumentando os níveis de fenólicos totais. Ainda segundo os autores, os valores observados para ensaios *in vitro* de atividade antioxidante com DPPH \cdot e ABTS $^{+}$ foram respectivamente 4,0 e 7,1 μ mol trolox/g, valores inferiores ao observados para a soja preta utilizada 5,33 e 10,93. Valores mais altos, provavelmente em consequência do maior teor de fenólicos totais observados, o que conferiu uma maior atividade antioxidante. Lin e Lai (2006), ao estudarem compostos bioativos em legumes e produtos germinados encontraram elevados teores de fenólicos totais e flavonóides para a soja preta em grãos, valores superiores à variedade amarela.

Tabela 3. Fenólicos Totais, Antocianinas totais e monoméricas e atividade antioxidante (DPPH· e ABTS⁺) com 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4°C (base seca) para.

Amostras	Fenólicos Totais (mg EAG/ 100g)*	Antocianina Total (mg cianidina-3-glicosídeo/100 g)	Antocianina monomérica (mg cianidina-3-glicosídeo/100 g)	DPPH· (µmol de Trolox/g)	ABTS·+ (µmol de Trolox/g)
Grão 1	277,44 ^{c,d} ± 4,08	60,41 ^c ± 1,73	49,09 ^c ± 0,86	5,28 ^{e,f,g} ± 0,11	10,90 ^f ± 0,08
Grão 15	277,70 ^{c,d} ± 1,54	61,82 ^c ± 3,05	50,95 ^c ± 4,07	5,31 ^{e,f} ± 0,18	11,00 ^f ± 0,05
Grão 30	280,78 ^{c,d} ± 7,34	61,21 ^c ± 1,55	52,91 ^c ± 1,11	5,40 ^{e,f,g} ± 0,17	10,89 ^f ± 0,09
EASP 1	601,01 ^a ± 16,55	384,69 ^a ± 29,00	360,69 ^a ± 19,69	11,13 ^b ± 0,88	16,21 ^c ± 0,05
EASP 15	613,20 ^a ± 20,84	383,54 ^a ± 8,36	366,01 ^a ± 17,48	11,55 ^b ± 0,25	16,84 ^b ± 0,12
EASP 30	603,28 ^a ± 9,29	397,06 ^a ± 8,08	368,38 ^a ± 17,84	12,45 ^a ± 0,09	17,55 ^a ± 0,08
EASP S/C 1	259,06 ^d ± 8,07	-	-	4,50 ^g ± 0,07	8,66 ⁱ ± 0,04
EASP S/C 15	260,39 ^d ± 4,85	-	-	4,70 ^{f,g} ± 0,07	9,09 ^h ± 0,08
EASP S/C 30	255,47 ^d ± 1,50	-	-	5,54 ^{d,e} ± 0,08	9,60 ^g ± 0,09
Quark 1	284,83 ^c ± 0,78	67,18 ^c ± 1,12	58,40 ^c ± 3,79	5,62 ^{d,e} ± 0,14	10,94 ^f ± 0,05
Quark 15	285,89 ^c ± 2,86	68,05 ^c ± 2,09	57,27 ^c ± 2,43	5,83 ^{d,e} ± 0,07	11,07 ^f ± 0,03
Quark 30	285,54 ^c ± 0,90	67,83 ^c ± 4,27	60,70 ^c ± 6,29	6,22 ^d ± 0,05	11,33 ^e ± 0,03
Petit 1	350,38 ^b ± 1,61	139,15 ^b ± 4,63	127,97 ^b ± 4,57	7,75 ^c ± 0,35	13,06 ^d ± 0,03
Petit 15	349,69 ^b ± 1,62	139,02 ^b ± 9,40	127,85 ^b ± 9,11	7,89 ^c ± 0,06	13,08 ^d ± 0,03
Petit 30	350,98 ^b ± 1,33	131,29 ^b ± 5,63	126,14 ^b ± 3,77	8,07 ^c ± 0,06	13,13 ^d ± 0,07

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si no nível de 5% de significância.

ESP: extrato aquoso de soja preta; ESP S/C: extrato aquoso de soja preta sem casca; *Petit suisse*: quark com 20% de polpa de amora.

*EAG: equivalente em ácido gálico

No trabalho de Bolanho e Beléia (2011), as amostras de extrato de soja comercial em pó, apresentaram em média 209 mg EAG/100g base seca. Estes valores assemelham-se aos valores encontrados para o ESP produzido sem casca, sendo estáveis ao longo do armazenamento. Também encontraram valores médios de atividade antioxidante para as amostras nos ensaios *in vitro* para DPPH[·] e ABTS⁺ respectivamente de 3,9 e 8,5 $\mu\text{mol trolox/g}$, próximos aos apresentados na Tabela 3 para o ESP s/c ao 1^o dia, valores estes de 4,50 e 8,66 $\mu\text{mol trolox/g}$ respectivamente.

Os valores para fenólicos totais apresentados para o quark não diferiram estatisticamente do grão de soja preta, enquanto que para *petit suisse* os valores foram significativamente superiores no nível de 5%, em virtude ao aumento no teor de antocianinas e outros flavonoides pela adição da polpa de amora (Tabela 3). As amostras de *petit suisse* permaneceram estáveis ao longo do armazenamento, demonstrando maior atividade antioxidante para ambos os ensaios (DPPH[·] e ABTS⁺), em relação ao grão, ESP S/C e Quark.

Segundo a Tabela 3, somente as amostras de grão de soja preta e *petit suisse* apresentaram resultados estáveis ao longo dos 30 dias de armazenamento para os ensaios de atividade antioxidante com DPPH[·] e ABTS⁺, não diferindo no mesmo produto no nível de 5%. Segundo a Tabela 2, estas amostras apresentaram valores de isoflavonas agliconas que não diferiram entre o 1, 15 e 30 dias de armazenamento. Dentre todas os tipos de amostras, o EASP apresentou a maior atividade antioxidante *in vitro* por ambas metodologias, bem como maior teor de fenólicos totais, sendo que, juntamente com o EASP S/C, apresentaram diferenças significativas na atividade antioxidante ao longo do armazenamento. Este aumento para os ensaios de DPPH[·] e ABTS⁺ é consequência do aumento nos teores de isoflavonas agliconas (Tabela 2). Para a amostra de quark, não houve diferença significativa para o ensaio com DPPH[·] ao longo do armazenamento, entretanto para o ensaio com ABTS⁺ existiu diferença significativa. Mesmo não existindo diferença significativa para o ensaio com DPPH[·], vale ressaltar que houve o aumento progressivo para ambos os ensaios entre a amostra ao longo do armazenamento, provavelmente com reflexo do aumento de isoflavonas agliconas. Em trabalho publicado por Lee et al. (2005), os autores pesquisaram a atividade antioxidante das isoflavonas agliconas e suas respectivas formas glicosiladas e malonil-glicosil.

Segundo resultados obtidos pelos autores, as formas agliconas daidzeína e genisteína apresentaram maior poder antioxidante para os ensaios com DPPH[•] e FRAP, tendo a forma genisteína apresentado os maiores resultados, além disso, as formas glicosiladas e malonil-glicosil apresentaram resultados similares para os ensaios, sugere-se portanto que o aumento na atividade antioxidante para os ensaios com DPPH[•] e ABTS⁺ observados neste trabalho sejam reflexo do aumento do teor de isoflavonas agliconas.

Segundo Arora, Nair e Strasburg (1998), todas as formas de isoflavonas possuem ação antioxidante, variando amplamente segundo sua estrutura, tendo a genisteína, com grupos hidroxila nas posições 5, 7 e 4 maior poder antioxidante. Como observado na Tabela 2, houve aumento no teor de agliconas (daidzeína e principalmente genisteína) com o armazenamento, refletindo-se na atividade antioxidante (Tabela 3). Em trabalho realizado por Chaiyasut et al. (2010), os autores avaliaram o efeito do tempo da fermentação por *Aspergillus oryzae* sobre o perfil de isoflavonas, visando uma maior atividade antioxidante. Segundo os autores, houve um aumento significativo nos teores de isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína) e redução das formas glicosiladas (daidzina e genistina), conforme existia um maior tempo de exposição ao processo fermentativo e isto se refletiu na atividade antioxidante por meio de ensaios com cátion ABTS, tendo um aumento progressivo nos valores obtidos para cada ensaio. Barbosa et al. (2006) avaliaram o perfil de isoflavonas e quantidades de compostos fenólicos em diferentes produtos a base de soja e sua influência na capacidade antioxidante e concluíram que a capacidade antioxidante não está apenas relacionada a quantidade de fenólicos totais, mas também a quantidade e forma das isoflavonas presentes.

5.4 COLORAÇÃO DOS PRODUTOS, PH E ACIDEZ TITULÁVEL

O produto desenvolvido, obtido a partir de ESP foi fermentado com cultura probiótica e ao final do processo adicionado de polpa de amora. Os resultados para cor, pH e acidez das amostras encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Valores para L*, a*, b*, pH e acidez com 1, 15 e 30 dias de armazenagem de extratos e produtos fermentados de soja preta a 4°C.

Amostra	L*	a*	b*	pH	Acidez
EASP S/C 1	66,22 ^a ± 0,34	2,48 ^h ± 0,36	3,80 ^a ± 0,32	6,82 ^a ± 0,01	0,06 ^h ± 0,01
EASP S/C 15	66,60 ^a ± 0,73	2,27 ^h ± 0,20	3,74 ^a ± 0,21	6,80 ^a ± 0,02	0,06 ^h ± 0,01
EASP S/C 30	66,67 ^a ± 0,61	2,67 ^h ± 0,11	3,67 ^a ± 0,20	6,78 ^a ± 0,02	0,10 ^h ± 0,01
EASP1	44,37 ^d ± 1,22	3,26 ^g ± 0,18	-1,44 ^{e,f} ± 0,10	6,59 ^b ± 0,01	0,09 ^h ± 0,01
EASP15	44,89 ^d ± 0,43	3,46 ^g ± 0,15	-1,23 ^e ± 0,09	6,56 ^b ± 0,01	0,09 ^h ± 0,01
EASP30	45,35 ^d ± 0,47	3,53 ^g ± 0,11	-1,20 ^e ± 0,15	6,56 ^b ± 0,01	0,10 ^h ± 0,01
EASPF1	50,32 ^c ± 0,07	5,22 ^f ± 0,28	1,80 ^b ± 0,26	4,59 ^c ± 0,01	0,34 ^g ± 0,02
EASPF15	51,94 ^b ± 0,21	5,54 ^{e,f} ± 0,14	1,61 ^{b,c} ± 0,12	4,48 ^d ± 0,02	0,41 ^f ± 0,01
EASPF30	52,98 ^b ± 0,89	6,02 ^d ± 0,13	1,09 ^d ± 0,13	4,25 ^h ± 0,01	0,53 ^e ± 0,01
Quark1	21,71 ^{e,f} ± 0,87	5,51 ^{e,f} ± 0,36	1,31 ^{b,c,d} ± 0,07	4,39 ^e ± 0,01	0,70 ^d ± 0,01
Quark15	22,52 ^e ± 0,83	5,77 ^{d,e} ± 0,10	1,12 ^{c,d} ± 0,12	4,35 ^f ± 0,00	0,71 ^{c,d} ± 0,01
Quark30	23,08 ^e ± 0,50	5,91 ^{d,e} ± 0,05	0,96 ^d ± 0,09	4,31 [†] ± 0,01	0,75 ^c ± 0,01
Petit1	18,98 ^g ± 0,83	9,09 ^c ± 0,64	-2,29 ^g ± 0,20	4,12 ^j ± 0,01	0,84 ^b ± 0,01
Petit15	19,47 ^g ± 0,43	9,99 ^b ± 0,13	-1,86 ^{f,g} ± 0,13	4,09 ^j ± 0,01	0,86 ^b ± 0,02
Petit30	20,94 ^f ± 0,86	10,44 ^a ± 0,40	-1,13 ^e ± 0,12	4,02 ^k ± 0,01	0,91 ^a ± 0,01

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si no nível de 5% de significância.

EASP: extrato aquoso de soja preta; EASP S/C: extrato aquoso de soja preta sem casca; EASPF: extrato aquoso de soja preta fermentado; *Petit suisse*: quark com 20% de polpa de amora.

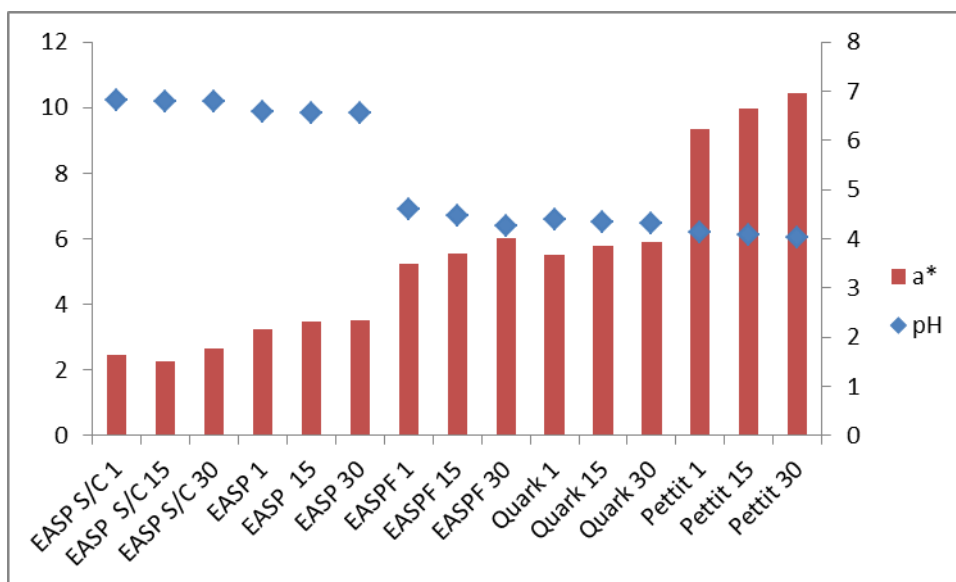
Observando a Tabela 4, verifica-se que os valores de pH nos diferentes produtos apresentaram diferença significativa. Para os ESP s/c e ESP, os valores iniciais de pH, foram respectivamente 6,82 e 6,59, diferindo no nível de 5%, não existindo diferença significativa durante os 30 dias de armazenamento. Segundo Vukosavljevic et al. (2006), antocianinas em solução apresentam caráter levemente ácido, o que pode ser observado por estes valores encontrados para os extratos. Entretanto, estes valores assemelham-se aos valores descritos Tashima e Cardello (2003) e Adeleke, Adeniyi e Akinrinmis (2000) para extrato aquoso produzido com soja amarela. Já os produtos fermentados (ESPF, Quark e *Petit suisse*) apresentaram redução de pH com o tempo de armazenamento em virtude do acúmulo de ácido láctico. A etapa de dessoragem ESPF, influenciou na diminuição do pH e aumento da acidez do quark, sendo que a adição da polpa de amora aumentou da acidez no *petit suisse*.

Na avaliação da coloração das amostras para o parâmetro L*(0 = Preto e 100 = Branco), o ESP s/c apresentou os valores mais altos, não existindo diferença significativa durante o período de armazenamento, sendo esta amostra a mais clara. Entretanto todos os grupos de amostras diferiram entre si, devido a diferenças químicas e estruturais, resultando na diminuição significativa da luminosidade. Alimentos que contém antocianinas sofrem influência direta do valor de pH que

reflete em sua cor. Segundo Andersen (1998), esta mudança na tonalidade deve-se à presença de grupos cromóforos, sensíveis a alterações de pH. Em uma solução, as antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais em equilíbrio de acordo com o valor de pH, sendo estas: o cátion *flavilium* (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela) (HEREDIA et al., 1998). De acordo com Rein e Heinonen (2010), o aumento de pigmentos ocasiona uma diminuição na luminosidade, fato que pode ser observado quando comparados os valores de L^* do ESP s/c e ESP, respectivamente em média $66,5 \pm 0,24$ e $44,87 \pm 0,49$, existindo diferença significativa entre as amostras.

Na Figura 9 pode-se observar que há uma relação direta entre o abaixamento de pH e aumento do valor do componente a^* , nas diferentes amostras durante o armazenamento.

Figura 9. Gráfico contendo os valores para o parâmetro a^* (sistema CIELAB) em relação aos valores de pH ao longo do armazenamento.



O *petit suisse* apresentou valores crescentes e mais altos para o componente a^* (+ vermelho, - verde), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) durante o período de armazenamento. Este aumento deve-se à diminuição do pH ao longo do armazenamento, bem como à concentração de antocianinas. Ao se comparar os valores obtidos para o extrato aquoso antes a após a fermentação, observou-se o

aumento significativo para os valores de a^* após a fermentação devido à diminuição no pH. Todas as amostras fermentadas apresentaram ao longo do armazenamento, diferença significativa entre o 1º e 30º dia de armazenamento, uma vez que houve queda gradual no valor de pH. Em trabalho realizado por Hu et al (2010), os autores pesquisaram e caracterizaram “natto” produzido com soja preta fermentado com *Bacillus natto*, onde foi observada diferença significativa para o parâmetro a^* durante o processo de fermentação, aumentando a vermelhidão com o maior tempo de exposição ao processo de fermentação. Para o parâmetro b^* (+ amarelo e – azul), as amostras do extrato aquoso antes da fermentação apresentavam valores negativos de b^* , sendo assim mais azul, apresentando após a fermentação valores positivos para b^* . Os valores negativos de b^* , devem-se ao fato do valor de pH do ESP se encontrar próximo a neutralidade (6,59). Segundo Março, Poppi e Scarminio (2008), em valores de pH acima de 6, ocorre formação de anidrobases ionizadas, apresentando coloração azul.

5.5 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E VISCOSIDADE

Na Tabela 5 estão os valores de viscosidade e capacidade de retenção de água (CRA) obtida para queijo tipo quark (sem polpa e açúcar) e queijo tipo *petit suisse*. Os valores da CRA e viscosidade não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre as amostras e tempos de armazenamento.

Tabela 5. Capacidade de retenção de água (CRA) e viscosidade (*centipoise*) de queijos tipo quark e *petit suisse* com 1, 15 e 30 dias de armazenagem a 4°C.

Amostra	CRA	Viscosidade
Quark1	43,70 ^a ± 0,22	902,60 ^a ± 24,87
Quark15	44,25 ^a ± 0,31	904,34 ^a ± 19,31
Quark30	44,01 ^a ± 0,22	913,62 ^a ± 14,91
Petit1	44,36 ^a ± 0,24	898,14 ^a ± 9,39
Petit15	43,99 ^a ± 0,26	902,99 ^a ± 17,00
Petit30	44,36 ^a ± 0,24	900,60 ^a ± 6,88

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si no nível de 5% de significância.

Segundo Damodaran, Parkin, Fennema (2010), polímeros solúveis como as proteínas auxiliam na viscosidade, existindo o aumento exponencial conforme a concentração. Ambas as amostras não diferiram no teor de proteínas (Tabela 1),

apresentaram valores similares para viscosidade (Tabela 5). Kovalenko e Briggs (2002) trabalharam com gel de proteína de soja e relataram que a viscosidade foi dependente da concentração de proteína. Ainda segundo Damodaran, Parkin, Fennema (2010), proteínas apresentam uma boa capacidade de retenção de água.

Os valores obtidos com quark e *petit suisse* para as análises de capacidade de retenção de água e viscosidade não diferiram entre as amostras no nível de 5% de significância, mantendo-se estáveis durante o período de armazenamento. Como descrito na Tabela 4, ambas as amostras apresentaram valores de pH próximo a 4,0, o que resultou em valores similares para a capacidade de retenção de água. Pednekar, Das, Sharma (2010), pesquisaram sobre as propriedades funcionais da soja e observaram na curva de solubilidade das proteínas da soja uma menor solubilidade em pH 4,0 devido ao ponto isoelétrico das proteínas.

A cultura utilizada para o processo de fermentação desenvolvida especialmente para produtos de soja, continha *Streptococcus thermophilus* produtor de exopolissacarídeo (EPS). Segundo Rimada e Abraham (2006), exopolissacarídeos podem ser utilizados como aditivos em produtos, uma vez que aumentam viscosidade. Sendo assim, bactérias produtoras de exopolissacarídeos também contribuem para o aumento da capacidade de retenção de água durante o armazenamento do produto (JOLLY et al. 2002). Entretanto, a produção de EPS não foi determinada neste trabalho.

A CRA do quark e *petit suisse* foi de aproximadamente 44%, nos diferentes tempos de armazenamento. Veiga et al. (2000) caracterizaram diferentes marcas de *petit suisse* e observaram variação de 40 a 90% na CRA. Entretanto, estas marcas comerciais apresentavam em sua composição. Sendo assim, o quark e *petit suisse* desenvolvidos apresentam CRA compatível com produtos comerciais. A CRA e estabilidade podem ser aumentadas com a adição de hidrocolóides.

5.6 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS NO QUEIJO TIPO PETIT SUISSE

Conforme apresentado na Tabela 6, a contagem de bactérias lácticas totais e probióticas apresentaram diferenças significativas durante o armazenamento para todos os tempos, existindo a tendência de decréscimo.

Segundo Denkova e Krastanov (2012), extrato aquoso de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, com ou sem a presença de *Streptococcus thermophilus* apresentam elevada contagem de células viáveis (10^{11} - 10^{14} UFC/g) apresentando elevada contagem por aproximadamente 20 dias de armazenamento sob-refrigeração. Para Awaisheh (2012), a redução na contagem destas bactérias podem ser por consequência da estocagem sob condições ácidas, pois alguns probióticos são susceptíveis a inativação quando armazenados em baixo pH (4,0). Para Lourens-Hatting e Viljoen (2001) a sobrevivência de bactérias probióticas em produtos fermentados está relacionada, dentre outros fatores, aos valores de pH e temperatura. *Lactobacillus acidophilus* apresenta pH ótimo para multiplicação entre 5,5 e 6,0, tendo elevada resistência ao armazenamento a temperaturas de refrigeração. Como pode-se notar, para o *Lactobacillus acidophilus*, durante o armazenamento a 4°C, não houve diferença significativa durante os 15 primeiros dias, o que não ocorreu com a *Bifidobacterium animalis*, onde houve redução significativa para todos os tempos amostrais, o que pode ser explicado pelo fato de as bifidobactérias serem microrganismos mais sensíveis, com pH ótimo entre 6,0 e 7,0, sendo menos tolerantes ao armazenamento refrigerado e sob condições mais ácidas (GOMES; MALCATA, 1999; LOURES-HATTING; VILJOEN, 2001).

Tabela 6. Contagem microbiana de lácticas totais, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* em *Petit suisse* com 1, 15 e 30 dias de armazenamento refrigerado(4°C), valores expressos em log UFC g⁻¹.

Amostra	Lácticas Totais*	<i>Lactobacillus acidophilus</i>**	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>***
Petit 1	9,91 ^a ± 0,03	7,95 ^a ± 0,01	9,96 ^a ± 0,02
Petit 15	9,59 ^b ± 0,05	7,81 ^a ± 0,05	9,67 ^b ± 0,04
Petit 30	8,96 ^c ± 0,06	7,59 ^b ± 0,11	9,31 ^c ± 0,05

Médias ± desvio na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si no nível de 5% de significância.

*MRS ágar, aerobiose (37°C/72h)

**MRS + bile bovina 0,15% p/v, aerobiose (37°C/72h)

***MRS + LP (cloreto de lítio 0,2% p/v + propionato de sódio 0,3% p/v), anaerobiose (37°C/72h)

Segundo a legislação vigente (BRASIL, 2007) um produto para ser considerado probiótico deve apresentar contagem de no mínimo 10^6 UFC g⁻¹ ou 10^8 UFC na porção durante a vida de prateleira. A cultura utilizada apresentava dois

microrganismos com alegações de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis subsp, lactis*). Ao longo dos dias, houve uma redução significativa para ambos os microrganismos, entretanto os valores apresentados ao final dos 30 dias de armazenamento permitem classificar o produto como probiótico.

5.7 ANÁLISE SENSORIAL DE QUEIJO TIPO *PETIT SUISSE*

Para a realização dos testes sensoriais, previamente foram conduzidas análises para segurança microbiológica para posterior submissão aos testes.

Para determinação da concentração ideal de açúcar a ser utilizada no produto em desenvolvimento, previamente foi realizado o teste sensorial Escala-do-ideal, o qual 65% dos julgadores classificaram como 12% o ideal de doçura para o queijo tipo *petit suisse*.

O teste de aceitação utilizando escala hedônica de 9 pontos contou com a participação 65 julgadores, dos quais 15 eram homens e 50 mulheres, com idades variando entre 20 e 50 anos. Dentre os julgadores, 92,3% afirmaram gostar/consumir produtos fermentados e 61,5% afirmaram gostar/consumir produtos de soja.

Na Tabela 7, encontram-se as médias e os desvios para cada parâmetro sensorial analisado. O parâmetro sensorial cor obteve uma média de 7,8 tendo uma alta aprovação (Figura 10), onde aproximadamente 95% dos julgadores atribuíram para este parâmetro notas entre 6 (gostei ligeiramente) a 9 (gostei extremamente).

Tabela 7. Aceitação sensorial de *Petit suisse* de soja preta.

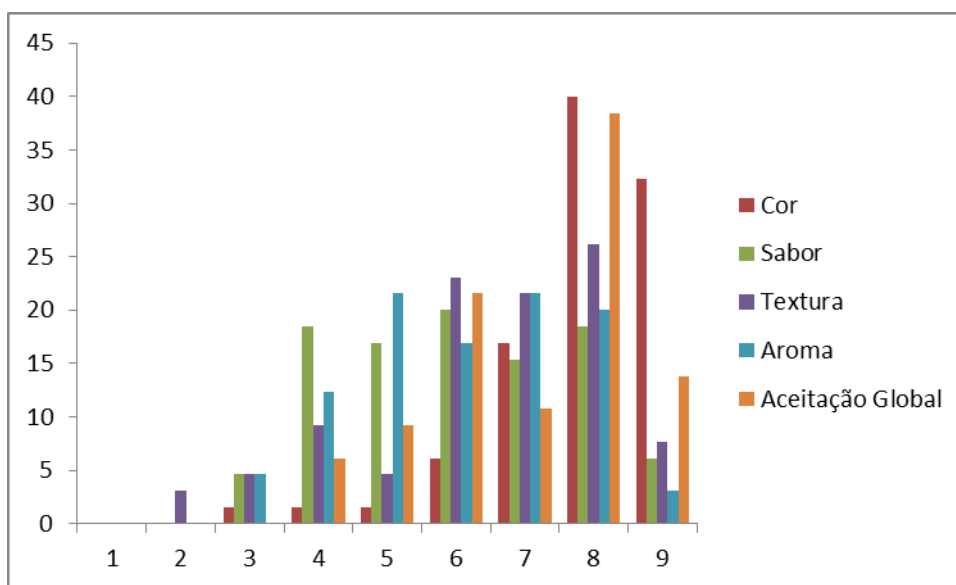
Cor	7,8 ± 1,2
Sabor	6,1 ± 1,8
Textura	6,4 ± 1,4
Aroma	6,1 ± 1,5
Aceitação Global	7,0 ± 1,4

Médias ± desvio

Para os parâmetros sabor e aroma, ambos obtiveram uma média de 6,1, correspondendo na escala ao gostei ligeiramente. Segundo a Figura 10, ambos os parâmetros obtiveram um moderado índice de rejeição e indiferença, sendo respectivamente 23% de notas entre 1 e 4 (rejeição) e 17% de nota 5 (indiferença)

para o sabor e 17% de rejeição e 21,5% de indiferença para a aroma. A média obtida para textura foi de 6,4 estando também dentro dos valores descritos para a aceitação, com 17% de rejeição e 4,6% de indiferença, com 78,4% de aprovação.

Figura 10. Porcentagem de julgadores para aceitação de queijo tipo *petit suisse* por meio de teste sensorial de aceitação com escala hedônica estruturada em 9 pontos.



Em trabalho realizado por Uliana, Venturini Filho e Uliana (2012), os autores desenvolveram uma bebida mista de soja e amora, aplicando teste sensorial por escala hedônica estruturada em 9 pontos, obtendo notas em média para os parâmetros sensoriais aroma, sabor e aceitação global respectivamente de 5,9, 6,33 e 6,52, valores semelhantes aos obtidos neste trabalho para o queijo tipo *petit suisse* com polpa de amora. Yang e Li (2010) obtiveram resultados semelhantes ao produzirem “iogurtes” probióticos produzidos com soja germinada, tendo em média para o sabor a nota 6,00, textura 6,91 e aceitação global 6,15.

Apesar do moderado índice de rejeição e indiferença obtido pelos parâmetros sabor e aroma, o queijo tipo *petit suisse* conseguiu uma alta aprovação para aceitação global, tendo aproximadamente 85% de notas entre 6 e 9, com uma média global 7,00 (gostei regularmente).

6. CONCLUSÃO

Dentre as amostras, o extrato de soja preta apresentou os teores mais elevados para fenólicos totais, conseqüentemente aumentando a capacidade antioxidante, reforçando a importância de se manter a casca durante o processo de obtenção do extrato soja preta. Além disso, houve um aumento na atividade antioxidante durante o armazenamento em decorrência do aumento nos teores de isoflavonas agliconas, existindo mesmo a baixas temperaturas à conversão de isoflavonas pela enzima β -glicosidase, sendo necessário um maior tempo de exposição para sua ação. Os queijos tipo quark e *petit suisse* com polpa de amora produzido a partir de extrato de soja preta apresentaram teores iniciais de isoflavonas agliconas superiores ao extrato de soja em virtude do processo de fermentação com cultura starter, bem como pela etapa de dessoragem que contribuiu para sua concentração. Ambos os queijos apresentaram como características, sendo fonte de isoflavonas e antocianinas, demonstrando atividade antioxidante nos ensaios *in vitro* com DPPH[•] e ABTS⁺, tendo o *petit suisse* um aumento na resposta dos ensaios de antioxidante pelo maior teor de compostos fenólicos pela adição da polpa de amora. Os níveis de contagem de microorganismos probióticos foram superiores aos exigidos pela legislação durante todo o período de armazenamento, caracterizando-o como um alimento probiótico, tendo uma nota de 7,0 para a aceitação global. Posteriormente pode-se melhorar as características sensoriais, para se adequar ao mercado brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELEKE, O. E; ADENIYI, B. A; AKINRINMIS, A. A. Microbiological quality of local soymilk: A public health appraisal. **African Journal of Biomedical Research**. v.3, p: 89 – 92, 2000.
- ADOM, K. K; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p.6182-6187, 2002.
- ANDERSEN, O.M.; CABRITA, L.; FOSSEN, T. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region, **Food Chemistry**, v.63,1998.
- ARAUJO, J. M. A; CARLOS, J. C. S; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.17, n.2, pp. 137-141, 1997.
- ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 356, n. 2, p. 133-141, 1998.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12 de 02 Janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em 14 de Junho de 2012.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 2 de 07 Janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em 14 de Junho de 2012.
- AWAISHEH, S. S. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. RIGOBELLO, E. C. Probiotics. 1.ed. Rijeka: Intech, 2012. P. 551-580.
- 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, n.4, p. 921-926, 2006.
- BARNES, S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. **Proceedings Society Experimental Biological Medicine**, v. 217, n. 3, p. 386-392, 1998.
- BAÚ, T. R. Desenvolvimento, caracterização e estabilidade de produto de soja fermentado com cultura de Kefir e adição de fibras. 2012, p.130. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

- BOLANHO, B.C; BELÉIA, A. P. Bioactivity compounds and antioxidant potential of soy products. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 539-546, 2011.
- BEHRENS, J. H; DA SILVA, M. A. Z. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.24, p. 431 – 439, 2004.
- BEASLEY, S; TUORILA, H; SARIS, P. E. J. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 159–162, 2003.
- BENEDETTI, A.C. E. P.; FALCÃO, D. P. Monitoramento da qualidade higiênico sanitária no processamento do leite de soja na Unisoja. **Revista e Ciência de Tecnologia em Alimentos**, v. 23, p. 200-205, 2003.
- BLAGDEN, D.; GILLILAND, S.E. Reduction of levels of volatile components associated with the “beany” flavor in soymilk by *Lactobacilli* and *Streptococci*. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 186–189, 2005.
- BOATTO, D. A; MESOMO, M. C; MADRONA, G. S; BRANCO, I.G; MATUMOTO-PINTRO, P. T. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo *petit suisse* de soja comum e de soja livre de lipoxigenase, enriquecidos com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 766-770, 2010.
- BRANDÃO, A. S. P; REZENDE, G. C; MARQUES, R. W.C. Crescimento agrícola no período 1999/2004: a explosão da soja e da pecuária bovina e seu impacto sobre o meio ambiente. **Economia Aplicada**. v.10, p. 249-266, 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da saúde. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substância bioativas e probióticos. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em 14 de Janeiro de 2012.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDINGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35. p. 873-876, 2000.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C; SIMÃO, A. S; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 897-902, 2003.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C; BERHOW, M.; MANDARINO, J. M. G; OLIVEIRA, M. C. N. Environmental and genetic variation of isoflavones content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1444-1451, 2009.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; FAVONI, S. P. G.; KIKUCHI, A. Extraction time for isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 515-518, 2002.

CALDEIRA, L. A; FERRÃO, S. P. B; FERNADES, S. A. D; MAGNAVITA, A.P.S; SANTOS, T. D. R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência rural**, v. 40, p. 2193-2198, 2010.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lípases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.

COLLADO, M.C; MERILUOTO, J; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065–1073, 2008.

CORREA, C. R.; LI, L; ALDINI, G.; CARINI, M.; CHEN, O.; CHUN, H. K.; CHO, S. M.; PARK, K, M.; RUSSEL, R, M.; BLUMBERG, J, B.; YEUM, K, J. Composition and Stability of Phytochemicals in five varieties of black soybeans (*Glycine max*). *Food Chemistry*, p. 1176-1184, 2010.

COWARD, L.; BRANES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daizein and their beta-glucosideconjugates: antitumor isoflavonas in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1961-1967, 1993.

CHEN, Y; LEE, S. L; CHOU, C. C. Fermentation with *Aspergillus awemori* enhanced contents of amino nitrogen and total phenolics as well as low-density lipoprotein oxidation inhibitory activity in black soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.3974-3979, 2011.

CHAIYASUT, C; KUMAR, T; TIPDUANGTA, P; RUNGSEEVIJITPRAPA, W. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 4120-4126, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 4.ed, 2010.

DONKOR, O. N; SHAH, N. P. Production of β -Glucosidase and Hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 15-20, 2008.

DORNAS, W.C; OLIVEIRA, T.T; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G; SANTOS, A.F; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, p. 241- 249, 2007.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **Embrapa Soja**. Soja em números (safra 2010/2011). Disponível em

<http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=2&op_page=294>. Acesso em 11 de Agosto de 2011.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **Embrapa Soja**. Soja na Alimentação. Disponível em:

<http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23#1>. Acesso em 23 de Junho de 2011.

FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation 2001. Disponível em:

<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em 13 de Julho de 2011.

FICHER, M; KOFOD, L. V; SCHOLS, H. A; PIERSMA, S. R; GRUPPEN, R; VORAGEN, A. G. J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates heat and humidity effects. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 552-556, 1975.

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, H.; ISHIDA K.; KAWAMURA, H.; SIGIMURA T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chemical Toxicology*. V.34, n.5, 457-461, 1996.

FUKUSHIMA, D. Recent progress in research and technology on soybeans. **Food Science and Technology Research**. v.7, p.08-16. 2001.

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

GIUSTI, M. M; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

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

GOLBITZ, P.; JORDAN, J.. Soyfoods: Market and Products. In: RIAZ, Mian N. **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 1-22, 2006.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed (1ª ed. digital). São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.

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

HEREDIA, F.J.; FRANCIA-ARICHA, E.M.; RIVAS-GONZALO, J.C; VICARIO, I. M; SANTOS-BUELGA, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes-I. PH effect. **Food Chemistry**, v.63, 1998.

HU, Y; GE, C; YUAN, W; ZHU, R; ZHANG, W; DU, L; XUE, J. *Characterization of fermented black soybean natto inoculated with Bacillus natto during fermentation.* **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p. 1194 – 1202, 2010.

HUNG, P. V; MAEDA, T; MIYATAKE, K; MORITA; N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v. 42, p. 185-190, 2009.

Instrução Normativa nº 53 de 29 de dezembro de 2000. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em:<
http://www.cidasc.gov.br/html/servico_animal/Inspecao%20Animal/ORIENTA%C7%D5ES%20SOBRE%20ROTULAGEM/LEITE%20E%20DERIVADOS/IN%2053_00_RTIQ%20queijo%20petit%20suisse.pdf> Acesso em 06 Junho de 2011.

JENG, T. L.; SHIH, Y. J.; WU, M. T.; SUNG, J. M. Comparisons of flavonoids and anti-oxidative activities in seed coat, embryonic axis and cotyledon of black soybeans. **Food Chemistry**, v.123, p.1112 –1116, 2010.

JOLLY, L.; SEBASTIEN, J. F. V.; DUBOC, P.; NEESER, J.R. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.82, p.367–374,2002.

KIM, H. K; KIM, J. N; HAN, S. N; NAM, J. H; NA, H. N; HA, T. J. Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. **Nutrition Research**. 2012.

KOVALENKO, I.V.; BRIGGS, J. L. Textural characterization of soy-based yogurt by the vane method. **Journal of Texture Studies**, v. 33, p. 105-118, 2002.

KUMURA, K;TANOUE, Y; TSUKAHARA, M; TANAKA, T; SHIMAZAKI, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4050–4056, 2004.

LAJOLO, F.M. Alimentos funcionais. Uma visão geral. In: De Angelis, R.C. **A importância dos alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidade degenerativa**. 2ª edição, São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

LEE, J. H; CHO, K. M. Changes occurring in compositional components of black soybeans maintained at room temperature for different storage periods. **Food Chemistry**. v.131, p.161–169, 2012.

LEE, C. H; YANG, L; XU, L. YEUNG, S. Y. V; HUANG, Y; CHEN, Z. Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavonas and their glycosides. **Food Chemistry**, v. 90, p. 735-741, 2005.

LEE, J. H.; KANG, N. S.; SHIN, S. O.; SHIN, S. H.; LIM, S. G.; SUH, D. Y.; BAEK, I. Y.; PARK, K. Y.; HA, T. J. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max L.*) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. **Food Chemistry**, v.112, p.226-231, 2009.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal AOAC International**, v. 88, p. 1269-1278, 2005.

LEROY, F.; VUYST, L.D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, **Food Science & Technology**, v.15, p.67-78, 2004.

LIN, P. Y.; LAI, H. M. Bioactive Compounds in Legumes and Their Germinated Products. **Journal of Food Science**, v.54, p. 3807–3814, 2006.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. ITP., 1997

LIU, M. C.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados proteicos de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p. 206-212, 2003.

LIU, X.; JIN, J.; WANG, G.; HERBERT, S.J. Soybean yield physiology and development of high-yielding practices in Northeast China. **Field Crops Research**, v.105, p.157-171, 2008.

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

MAGEE, P. J.; ROWLAND, R. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 513–531, 2004.

MARCELINNI, P. S.; CHAINHO, T. F.; BOLINI, H. M. A. Doçura ideal e análise de aceitação de suco de abacaxi concentrado reconstituído adoçado com diferentes edulcorantes e sacarose. **Alimentos e Nutrição**, v.16, p.177-182, 2005.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**. v.31, p.1218-1223, 2008.

MARUYAMA, L. Y.; CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo petit suisse potencialmente probiótico: Influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 386-393, 2006.

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

MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal Food Science**, v.58, p.144-147, 1993.

MESSINA, M. Overview of the health effects of soyfoods. In: RIAZ, Mian N. **Soy Applications in food**, Boca Raton: Taylor & Francis, p. 23-38, 2006.

MORAES F. P; COLLA L. M. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 99-112, 2006.

MORAES, R. M; HAJ-ISA, N.; M. A.; ALMEIDA, T. C. A.; MORETTI, R. H.; Efeito da Desodorização nas características sensoriais de extratos hidrossolúveis de soja obtidos por diferentes processos tecnológicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 46-51, 2006.

MUJOO, R; TRINH, D.T; NG, P.K.W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**, v.82, p. 265–273, 2002.

OLIVEIRA, A. S. Desenvolvimento de inoculante para fermentação láctica de silagens: utilização de resíduos agroindustriais. Londrina: UEL, 1995. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, 1995.

OTIENO, D.O., ASHTON, J.F., SHAH, N.P. Stability of β -glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in fermented soymilk during processing and storage. **Journal of Food Science**, v.70, p.236–241, 2005.

OZER, B. H; BELL, A. E; GRANDISON, A. S; ROBINSON, R. K. Rheological Properties of Concentrated Yogurt (labneh). **Journal of Texture Studies**, v. 29, p. 67-79. 1998.

PEDNEKAR, M.; DAS, A. K. V, R.; SHARMA, A. Radiation processing and functional properties of soybean (*Glycine max*). **Radiation Physics and Chemistry**, v.79, p. 490–494, 2010.

PRUDENCIO, E. S.; BENEDET, H. D. Aproveitamento do soro de queijo na obtenção de extrato hidrossolúvel soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 97-101, 1999.

QIN, Y; JIN, Xiao-nan; DONG, P. H. Comparison of Antioxidant Activities in Black Soybean Preparations Fermented with Various Microorganisms. **Agricultural Sciences in China**. v.9, p.1065-1071, 2010.

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

REIN, M. J; HEINONEN, M. Stability and Enhancement of Berry Juice Color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3106 – 3114, 2004.

- REQUENA, T. PELÁEZ, C. Revisión: actividad antimicrobiana de bacterias lácticas, producción de bacteriocinas. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 31, p. 19-44, 1995.
- RIMADA, P.S.; ABRAHAM, A.G. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v.16, p. 33–39, 2006.
- ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. 105-10, 2002.
- ROBINSON, R.K. Therapeutic properties of fermented milks. New York: Elsevier, 186p, 1991.
- ROSA, A. M.; CLAVISO, J.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Alimentos fermentados a base de soja (*Glycine Max (Merril) L.*): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados as isoflavonas e seus açúcares. **Brazilian Journal of Biosciences**. v. 7, p. 454-462, 2009.
- ROSSI, E. A; ROSIER, I; DÂMASO, A. R; CARLOS, I. Z; VENDRAMINI, R. C; ABDALLA, D. S. P. TALARICO, V. H; MINTO, D. F. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 93-99, 2004.
- ROSTAGNO, M.A.; ARAÚJO, J.M.A.; SANDI, D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. **Food Chemistry**, v.78, p.111-117, 2002.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; & MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.
- 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.133-139, 2005.
- SCALABRINI, P., ROSSI, M., SPETTOLI, P.; MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 213-219, 1998.
- SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, v.134, p.1333-1343, 1998.
- SILVA, M. M.; SANTOS, M. R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v.36, p.1219-1227, 2002.
- SILVA, C. E.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; MÔNACO, A. P. A. Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos

grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 150-156, 2012.

STRINGHETA, P. C.; BOBBIO, P. A. Copigmentação de antocianinas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.34-37, 2000.

STIPP, E. J. Efeito de aditivos sobre a fermentação láctica desenvolvida por *Lactobacillus acidophilus*. Trabalho de conclusão de curso (TCC), Universidade Estadual de Londrina, 1996.

SWAIN, T.; HILLS, W.G. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-69, 1959.

TAKAHASHI, R; OHMORI, R; KRYOSE, C; MOMIYAMA, Y; OHSUZU, F; KONDO, K. Antioxidant activities of Black and yellow soybeans against Low Density Lipoprotein Oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.4578-4582, 2005.

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

TAY, S.L.; XU, G.Q.; PERERA, C.O. Aggregation profile of 11S, 7S and 2S coagulated with GDL, **Food Chemistry**, v.91, n. 3, p. 457-462, 2005.

ULIANA, M. R; VENTURINI FILHO, W. G; ULIANA, L. R. Nota Científica: Teste de aceitação de bebida mista de soja e amora. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 174-181, 2012.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de Bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.29, p. 83-104, 2008.

VEIGA, P.G.; CUNHA, R. L; VIOTTO, W.H; PETENATE, A. J. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo *petit suisse* brasileiro. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.20, p. 349-357, 2000.

VEIGA, P.G.; VIOTTO, W.H. Fabricação de queijo *petit suisse* por ultrafiltração de Leite coagulado. Efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.21, p. 267-272, 2001.

Vinderola, C.G.; Reinheimer, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v.9, p. 497-505, 1999.

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

- VUKOSAVLJEVIC, P; BUKVIC, B; JANKOVIC, M; PETROVIC, T; STEVANOVIC, S. Change of juice color during raspberry processing in fruit juice and fruit concentrate. **Journal of Agricultural Science**, v. 51, p. 99-115, 2006.
- WANG, H. J; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2377- 2383, 1996.
- 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, p.333-338, 2003.
- YANG, M; LI, L. Physicochemical, Textural and *Sensory* Characteristics of Probiotic Soy Yogurt Prepared from Germinated Soybean. *Food Technology and Biotechnology*. v.48, p. 490-496, 2010.
- YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with diferente solvents using simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. v. 63, p. 978-986, 2012.
- XU, B; CHANG, S. K. C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled Bean and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolics acids, anthocyanins and isoflavonas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, p. 8365-8373, 2008.

Anexo 1



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL:	266/2011
CAAE:	0242.0.268.000-11
Processo:	27238/2011
Folha de Rosto:	461495
Pesquisador(a):	Sandra Garcia
Unidade/Órgão:	Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos - DCTA /CCA

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"Desenvolvimento de *petit suisse* probiótico a base de extrato hidrossolúvel de soja preta"

Situação do Projeto: **APROVADO**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Londrina, 03 de Outubro de 2011.



Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite para os provadores do produto fermentado de soja preta no teste de escala-do-ideal.

“DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE PROBIÓTICO A BASE DE EXTRATO AQUOSO DE SOJA PRETA”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE PROBIÓTICO A BASE DE EXTRATO HIDROSSOLUVEL DE SOJA PRETA”, realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, Londrina/PR. O objetivo da pesquisa é desenvolver um produto fermentado a base de soja PRETA, utilizando cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*). A sua participação é muito importante, e irá requerer cerca de 15 minutos. Você participará como provador e irá consumir produtos fermentados de soja preta formulados, sendo solicitado a dar sua opinião sobre a intensidade de doçura, dentre os produtos apresentados. Será realizada uma sessão e você poderá fazê-la no horário 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. O produto apresentado possui efeitos benéficos como a diminuição no tempo de trânsito intestinal e auxílio na prevenção de doenças crônicas e 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 a interrupção do consumo do produto. Informamos que o senhor não pagará e nem será remunerado por sua participação. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Profª Sandra Garcia, DCTA/UEL, sgarcia@uel.br, (43) 3371- 4080), 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 3371 – 2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2012.

Pesquisador Responsável
Sandra Garcia

Marsilvio Lima de Moraes Filho
Aluno de mestrado

Eu, _____ , tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura : _____

Data: _____

ANEXO 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite para os provadores do produto fermentado de soja preta na análise de aceitação.

“DESENVOLVIMENTO DE PETIT SUISSE PROBIÓTICO A BASE DE EXTRATO AQUOSO DE SOJA PRETA”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE PROBIÓTICO A BASE DE EXTRATO HIDROSSOLUVEL DE SOJA PRETA”, realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, Londrina/PR. O objetivo da pesquisa é desenvolver um produto fermentado a base de soja PRETA, utilizando cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*). A sua participação é muito importante, e irá requerer cerca de 15 minutos. Você participará como provador e irá consumir produtos fermentados de soja preta formulado, sendo solicitado a dar sua opinião sobre as características do produto (cor, aroma, sabor, etc), informando o quanto você gostou de cada atributo. Será realizada uma sessão e você poderá fazê-la no horário 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. O produto apresentado possui efeitos benéficos como a diminuição no tempo de trânsito intestinal e auxílio na prevenção de doenças crônicas e 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 o senhor não pagará e nem será remunerado por sua participação. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Prof^a Sandra Garcia, DCTA/UEL, sgarcia@uel.br, (43) 3371- 4080), 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 3371 – 2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2012.

Pesquisador Responsável

Sandra Garcia

Marsilvio Lima de Moraes Filho
Aluno de mestrado

Eu, _____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura : _____

Data: _____