



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS**

**PAOLA DA SILVA FONSECA**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL DE SOJA E SORO DE QUEIJO,  
FERMENTADA COM *Lactobacillus acidophilus* ADICIONADA  
DE *Saccharomyces boulardii* E CARBOXIMETILGLUCANA**

---

Londrina  
2017

PAOLA DA SILVA FONSECA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL DE SOJA E SORO DE QUEIJO,  
FERMENTADA COM *Lactobacillus acidophilus* ADICIONADA  
DE *Saccharomyces boulardii* E CARBOXIMETILGLUCANA**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez

Londrina

2017

PAOLA DA SILVA FONSECA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL SOJA E SORO DE QUEIJO,  
FERMENTADA COM *Lactobacillus acidophilus* ADICIONADA  
DE *Saccharomyces boulardii* E CARBOXIMETILGLUCANA**

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, área e concentração em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferido pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez

UNOPAR

---

Prof. Dr. Agostinho Ludovico

UNOPAR

---

Profa. Dra. Caroline Maria Calliari

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Londrina, 23 de março de 2017.

Dedico esta tese a minha mãe, Edna, que vive por mim  
e que sempre esteve presente me ensinando as coisas  
essenciais da vida como honestidade, respeito, fé,  
lealdade, humildade, dignidade e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me iluminar e me dar forças para seguir todos os dias.

À minha querida mãe, Edna, que sempre me apoiou e esteve comigo, amando e cuidando.

Aos meus padrinhos, Valdemir e Lúcia, que são pessoas maravilhosas que sempre estiveram presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

Às minhas irmãs, Rafaela e Ana Flávia, que são pessoas incríveis e companheiras.

Aos meus amigos, Aline e Renan, que sempre estiveram comigo tornando meus dias mais alegres.

Ao meu orientador, professor Raul, pelos ensinamentos e humildade. Obrigada por confiar em mim até nos momentos em que errei.

Aos professores do programa de Mestrado pelos ensinamentos e paciência.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Raul, Prof. Dr. Agostinho e Profa. Dra. Caroline por todas as contribuições neste trabalho.

Aos participantes da análise sensorial, pois sem a participação deles eu não teria esta conquista.

Aos companheiros de laboratório que passaram os dias comigo dividindo seus conhecimentos.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

***Charles Chaplin***

FONSECA, Paola da Silva. **Desenvolvimento de bebida à base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo, fermentada com *Lactobacillus acidophilus* adicionada de *Saccharomyces boulardii* e carboximetilglucana.** 2017. 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – UNOPAR, Londrina, 2017.

## RESUMO

A demanda por alimentos saudáveis e nutritivos vem impulsionando o desenvolvimento de novos produtos. A busca por alimentos naturais, com inclusão de micro-organismos probióticos, tanto leveduras como bactérias, tem sido, nos últimos anos, o objetivo de várias pesquisas e também motivado o desenvolvimento deste tipo de novos produtos por parte das indústrias com um apelo à saúde com uma boa aceitação por parte dos consumidores que levam uma vida ativa e procuram uma situação de bem estar. O objetivo deste trabalho foi a elaboração de uma bebida utilizando extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo, fermentada com cultura probiótica e adição de *Saccharomyces boulardii* e carboximetilglucana fornecendo ao novo produto características antidiarreicas e imunomoduladoras. A estabilidade do produto no armazenamento em geladeira (5°C-7°C) foi definida pela contagem de *Lactobacillus acidophilus* e *Sacharomyces boulardii*, bem como determinações de pH e acidez. A composição proximal do novo produto foi determinada utilizando as técnicas analíticas preconizadas pelo Instituto Adolfo Lutz e AOAC. A bebida apresentou-se estável com contagens de *Lactobacillus acidophilus* superior a 7 log UFC/mL e contagens de *Saccharomyces boulardii* superior a 8 log UFC/mL, ao longo de 35 dias de armazenamento nas condições mencionadas acima. O teor de proteínas foi de 1,05 %, umidade 78,23 %, cinzas 1,25 %, lipídios 0,00 % e 19,47 % de carboidratos. Assim, setenta (70) provadores não treinados utilizaram uma escala hedônica de 9 pontos e interesse de compra do produto. Os resultados demonstraram que a bebida teve excelente aceitação pelos julgadores, principalmente nos atributos sabor 99,98 %, aparência 95,66 % e aroma 92,70 %.

**Palavras-chave:** *Glycine max*. Probióticos. Micro-organismos.

FONSECA, Paola da Silva. **Desenvolvimento de bebida à base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo, fermentada com *Lactobacillus acidophilus* adicionada de *Saccharomyces boulardii* e carboximetilglucana.** 2017. 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – UNOPAR, Londrina, 2017.

### ABSTRACT

The demand for healthy and nutritious foods has been driving the development of new products. The search for natural foods, including probiotic microorganisms, both yeast and bacteria, has been the objective of several researches in recent years and also motivated the development of this type of new products by the industries with a health appeal with a good Acceptance by consumers who lead an active life and seek a welfare situation. The objective of this work is the elaboration of a beverage using water soluble soybean extract and cheese serum, fermented with probiotic cultures and addition of carboxymethylglucan and *Saccharomyces boulardii*, providing the new product with immunomodulatory and antidiarrheal characteristics. Thus, seventy (70) untrained tasters used a hedonic school of 9 points and interest in purchasing the product. The stability of the product in the refrigerator storage (5°C-7°C) was defined by the count of *Lactobacillus acidophilus* and *Sacharomyces boulardii*, as well as, determinations of pH and acidity. The centesimal composition of the new product was determined using the analytical techniques recommended by the Instituto Adolfo Lutz and AOAC. The beverage was stable with counts of *L. acidophilus* greater than 7 Log CFU / mL and counts of *S. boulardii* greater than 8 Log CFU / mL, over 35 days of storage under the conditions mentioned above. The protein content was 1.05%, moisture 78.23%, ashes 1.25%, lipids 0.00% and 19.47% carbohydrates. The results showed that the beverage had excellent acceptance mainly in the attributes 99.98% taste, appearance 95.66% and aroma 92.70%.

**Keywords:** *Glycine max*. Probiotics. Microorganisms.



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>13</b>
1.1 SOJA.....	13
1.1.1 Extrato hidrossolúvel de soja.....	13
1.2 SORO DE QUEIJO.....	14
1.3 MICRO-ORGANISMO PROBIÓTICO.....	15
1.3.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	16
1.3.2 <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	16
1.4 CARBOXIMETILGLUCANA (CMG).....	17
1.5 POLIDEXTROSE.....	18
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>20</b>
<b>3 ARTIGO.....</b>	<b>25</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 PRODUÇÃO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA.....	29
2.2 PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> .....	29
2.3 PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i> .....	29
2.4 OBTENÇÃO DA CARBOXIMETILGLUCANA (CMG).....	30
2.5 PRODUÇÃO DA BEBIDA.....	30
<b>3 ANÁLISES.....</b>	<b>31</b>
3.1 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS.....	31
3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	32
3.2.1 Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 (Chr. Hansen) na bebida.....	32
3.2.2 Contagem de <i>Saccharomyces boulardii</i> na bebida.....	32
3.3 ANÁLISE SENSORIAL.....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BEBIDA.....	33
4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA BEBIDA.....	34
4.3 CONTAGEM DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> LA-5 (CHR. HANSEN) DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	35
4.4 CONTAGEM DE <i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i> DURANTE O	

ARMAZENAMENTO.....	35
4.5 RESULTADO DA ANÁLISE SENSORIAL.....	36
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>40</b>

## INTRODUÇÃO

O grão de soja é um produto rico em proteínas de alta qualidade e seus derivados tem se revelado veículos apropriados de culturas probióticas. O grão de soja contém oligossacarídeos como a rafinose e a estaquiose que não são digeridos pelos humanos, porém são metabolizados por bactérias probióticas (LIENER, 1994).

Pelas características nutricionais do grão de soja, pelo elevado teor de proteínas, pelo teor de minerais e fibras, a quantidade reduzida de gordura saturada e ausência de colesterol faz com que a relação entre o consumo desse produto e a saúde humana seja amplamente investigada (GRIESHOP; FAHEY, 2001; MORAIS; SILVA, 2000; YOUNG, 1991).

O soro de queijo é obtido durante a fabricação de queijo. Ocorre retenção de 55% dos nutrientes presentes no leite. Pode ser produzido através da ação enzimática ou ácida dando origem a dois tipos de soro, o ácido ( $\text{pH} < 5$ ) e o soro doce ( $\text{pH} > 6-7$ ). O soro ácido, em geral, contém mais cinzas e um menor teor proteico do que o soro doce, tornando-se mais limitado seu uso na alimentação humana devido ao gosto ácido e ao elevado teor salino (WEETAL et al., 1974; KOSIKOWSKI, 1979; MAWSON, 1994; SISO, 1996).

Reparação celular, construção e reparação de músculos e ossos, energia para quem pratica atividades físicas e outros benefícios ligados a processos metabólicos do corpo, como atividade imunoestimulante são as principais funções biológicas das proteínas do soro do leite bovino, protegendo também o sistema cardiovascular e modulando a atividade antimicrobiana e antiviral (SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006).

Atualmente, probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

A combinação de bactérias probióticas e de substâncias prebióticas são referências dos simbióticos, que tem por objetivo afetar benéficamente o hospedeiro melhorando a sobrevivência e implantação de micro-organismos vivos no sistema digestivo e também por favorecer seletivamente o crescimento ou atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde no cólon (O’SULLIVAN, 2001; ARAUJO, 2007).

Por possuir alta capacidade de adesão ao epitélio intestinal onde desempenha importante papel melhorando a digestibilidade de produtos lácteos, o *Lactobacillus acidophilus* é o mais recomendado como suprimento dietético e diminui

também os níveis de colesterol no sangue por sua co-precipitação com sais biliares e controle preventivo de infecções intestinais (GONÇALVES, 2009).

O *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) é citado na produção de fermentados de leite por todo mundo, estando dentre as diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*. O crescimento do seu uso é devido não possuir efeitos adversos no gosto, na aparência e palatabilidades dos produtos, e também sua capacidade de sobrevivência no produto até o consumo. O LA-5 sobrevive à passagem pelo estômago, é tolerante à acidez do estômago e também à bile e às enzimas digestivas. Os efeitos do consumo de *Lactobacillus acidophilus* são o balanceamento da flora intestinal, a redução da diarreia, a melhoria na digestão de lactose e a redução do colesterol (LEE; SALMINEN, 2009).

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura termotolerante (cresce na temperatura de 37°C), não patógena e muito utilizada na medicina humana (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993)

Foi constatado que a terapia com *Saccharomyces boulardii* melhora significativamente a bioestrutura das fezes de pacientes com diarreia crônica idiopática e não influencia sobre a microbiota das fezes em indivíduos saudáveis (SWIDSINSKI et al, 2010). Surawicz et al. (2000) afirmam que para tratar pacientes com reincidência de diarreia associada à *Clostridium difficile*, a *Saccharomyces boulardii* tem sido muito utilizada.

A carboximetilglucana é obtida através da solubilização da  $\beta$ -glucana, que em *Saccharomyces cerevisiae* é composta de resíduos de glicopiranosil  $\beta$ 1-3 e  $\beta$ 1-6 (KLIS et al., 2002) e apresenta atividades imunomoduladoras e sobre o envelhecimento celular (MAGNANI, CASTRO-GÓMEZ, 2008; ARAUJO et al., 2015).

Capazes de atuar como estimulantes da atividade imunológicas no hospedeiro estão as  $\beta$ -glucanas polímeros de glicose, componentes estruturais da parede celular de leveduras. É através das células imunocompetentes e/ou seus mediadores químicos que ocorre a ativação do sistema imune (BROWN, GORDON, 2003; KO, LIN, 2004; KIN et al., 2006).

A povidexose é considerada como um alimento funcional sendo parcialmente fermentada no intestino grosso, mas não é digerido nem absorvido no intestino delgado (PFIZER, 1978). A povidexose é um polissacarídeo sintetizado pela polimerização randômica da glicose (STUMM; BATLES, 1997), De acordo com Jie (2000) este polímero é extremamente estável, incolor e não apresenta sabor residual, sendo também altamente estável dentro de uma faixa ampla de pH, temperatura, condições de processamento e estocagem. A

polidextrose pode ser também considerada como pré-biótico, pois estimula o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias e a fermentação contínua ao longo do cólon (JIE et al., 2000).

Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma bebida à base de extrato hidrossolúvel de soja, soro de queijo e manoproteína. Fermentada por *Lactobacillus acidophilus* (La5), adicionada de *Saccharomyces boulardii*, além de desenvolver a tecnologia de produção e determinar a composição proximal da bebida, sua estabilidade no armazenamento e realizar análise sensorial visando verificar a aceitabilidade da bebida.

# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Soja

As características nutricionais da soja, o elevado teor de proteínas, o teor de minerais e fibras, a quantidade reduzida de gordura saturada e ausência de colesterol faz com que a relação entre o consumo desse produto e a saúde humana seja amplamente investigada (GRIESHOP; FAHEY, 2001; MORAIS; SILVA, 2000; YOUNG, 1991).

A soja tem sido pesquisada, também, como fonte de fitoquímicos, entres os quais os flavonoides, e observada também uma relação entre o seu consumo e a redução dos riscos de doenças crônicas não infecciosas como as doenças cardiovasculares e também alguns tipos de cânceres e osteoporose (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; LICHTENSTEIN, 1998; MESSINA, 1991; TAVARES; PITANGA; MORAIS; SILVA, 2000; SILVA; MORAIS, 2000).

O grão de soja e seus derivados possuem um valor nutricional e funcional devido à ação moduladora em certos mecanismos fisiológicos de proteínas isoflavonas e com propriedades tecnológicas para indústria de alimentos. Este produto tornou-se motivos de estudos (CIABOTTI, 2006).

Para que haja uma redução do colesterol e o risco de doenças cardiovasculares é necessário o consumo diário de 25 g de proteínas de soja (FDA, 1999). A composição dos grãos depende de fatores genéticos, como por exemplo, a sua cultivar e ambientais. A constituição do grão de soja é de 8% de cascas, 90% cotilédones, 2% hipocótilos, e são os cotilédones que contêm a maioria dos lipídeos e proteínas (LIU, 1999).

As isoflavonas, que formam compostos fenólicos presentes no grão de soja, se apresentam em 12 formas: três formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliceteína), três formas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina) e seis formas conjugadas (acetil ou malonil-glicosídicas) (LIU, 1999). Não é somente pelas características genéticas a influência das isoflavonas, mas também ambientais, pois nas regiões mais frias há uma maior produção desses compostos (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999).

### 1.1.1 Extrato hidrossolúvel de soja

Entre todos os produtos derivados de soja devido as suas características químicas e nutricionais, destaca-se o extrato hidrossolúvel de soja conhecido como “leite de

soja”. (HASLER, 1998).

O extrato hidrossolúvel de soja possui uma condição de aceitação limitada por apresentar características sensoriais semelhantes ao “feijão cru”, devido a compostos voláteis de baixo peso molecular que são produtos da ação das lipoxigenases, e também por apresentar um sabor ruim com alto teor de oligossacarídeos como a rafinose e estaquiase (RIBEIRO et al., 1987; HOU et al., 2000).

Esses oligossacarídeos promovem o crescimento de micro-organismos probióticos como as bifidobactérias sendo considerados prebióticos (HOU et al., 2000; TAMIME et al., 1995; SCALABRINI et al., 1998).

## 1.2 Soro de queijo

De acordo com Almeida; Tamine e Oliveira (2008) o soro é o principal subproduto na indústria de queijo. Durante a produção de queijo, avalia-se que para 10L de leite são obtidos cerca de 6 a 9 L de soro.

O soro de queijo é obtido durante a fabricação de queijo. Ocorre retenção de 55% dos nutrientes presentes no leite. Pode ser produzido através da ação enzimática ou ácida dando origem a dois tipos de soro, o ácido ( $\text{pH} < 5$ ) e o soro doce ( $\text{pH} > 6-7$ ). O soro ácido, em geral, contém mais cinzas e um menor teor proteico do que o soro doce, tornando-se mais limitado seu uso na alimentação humana devido ao gosto ácido e ao elevado teor salino (WEETAL et al., 1974; KOSIKOWSKI, 1979; MAWSON, 1994; SISO, 1996).

O soro de leite é constituído por volta de 93,6 % de água e 6,4% de sólidos, sendo eles a lactose, proteínas e gorduras (WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996). A fração proteica do soro é composta por cerca de 50% de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), 20%  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA), 15% glicomacropéptido, 15% de peptídios e outras proteínas minoritárias (imunoglobulinas, lactoferrinas, latoperoxidase, albuminas séricas, lisozima e fatores de crescimento) (SMITHERS et al., 1996; SMITHERS, 2008).

Segundo Wit (1998); Steijns & Hooijdonk (2000); Rodrigues (2001); Sgarbieri (2005); Hernández et al., (2008) as principais propriedades biológicas dos peptídeos derivados da ( $\beta$ -LG) são: antioxidante, imunoestimulante, anti-hipertensiva, antimicrobiana e hipocolesterolêmico.

A segunda maior fração proteica presente no soro de leite denomina-se  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA). É rica em aminoácidos essenciais, principalmente triptofano, um aminoácido precursor de niacina, uma vitamina hidrossolúvel (SGARBIERI, 2005;

HARAGUCHI et al., 2006; KRISSENSSEN, 2007; RENHE, 2008).

As IgG, IgA, IgM, IgD e IgE são as cinco classes de imunoglobulinas presentes no leite bovino, porém a imunoglobulina IgG é a principal por constituir 80% do total, e é a única que permanece presente no leite bovino depois da fase do colostro (HARAGUCHI et al., 2006; GEORGE et al., 2013). De acordo com Santos et al. (2011), a IgG oferece proteção a infecções, pois estimula a produção de linfócitos, contudo sua principal ação biológica é a atividade antioxidante.

### **1.3 Micro – organismo probiótico**

Com o avanço dos estudos, novas espécies de probióticos foram encontradas e o conceito foi aperfeiçoado, pois estavam inicialmente apenas relacionados ao balanço da flora intestinal. Atualmente, probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Para exercerem os efeitos benéficos aos hospedeiros depois de ingeridas, as células probióticas devem ter capacidade de sobrevivência às condições de estresse existentes no trato gastrointestinal, como secreções, presença de sais biliares e enzimas digestivas e também manter sua viabilidade e atividade metabólica no intestino. Com relação aos desafios tecnológicos para a produção industrial de células, devem ser mantidas em estados estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto (SAAD, 2006; ARAÚJO, 2007).

A combinação de bactérias probióticas e de substâncias prebióticas são referências dos simbióticos, que tem por objetivo afetar benéficamente o hospedeiro melhorando a sobrevivência e implantação de micro-organismos vivos no sistema digestivo e também por favorecer seletivamente o crescimento ou atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde no cólon (O’SULLIVAN, 2001; ARAUJO, 2007).

Há um interesse considerável por parte das indústrias em desenvolver produtos alimentícios que contenham os probióticos e prebióticos e ingredientes funcionais por apresentarem efeitos benéficos (STANTON et al., 1998).

As espécies mais utilizadas de probióticos que possuem características tecnológicas interessantes como baixas taxas de pós-acidificação durante o armazenamento pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GOMES; MALCATA, 1999).



### 1.3.1 *Lactobacillus acidophilus*

Os *Lactobacillus* são encontrados em ambientes ricos em carboidrato e são apresentados na forma de bacilos ou cocobacilos. São Gram-positivos, catalase negativos, anaeróbios facultativos, não esporulam e são pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL) (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

A variação de temperaturas das espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* é de 2 a 53°C para o seu crescimento; e para seus valores ótimos, geralmente de 30 a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2, sendo no pH 5,0 ou menos que o crescimento pode ocorrer. Em meios neutros ou alcalinos, o crescimento é frequentemente reduzido (KANDLER; WEISS, 1986).

Os *Lactobacillus* podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos com essa intolerância e podem também reduzir a constipação e a diarreia infantil, ajudando também na resistência a infecções por *Salmonella*, além de aliviar a síndrome do intestino irritável (KOMATSU et al. 2008).

Por possuir alta capacidade de adesão ao epitélio intestinal, onde desempenha importante papel melhorando a digestibilidade de produtos lácteos os *L. acidophilus* são os mais recomendados como suprimento dietético e diminuem, também, os níveis de colesterol no sangue por sua co-precipitação com sais biliares e controle preventivo de infecções intestinais (GONÇALVES, 2009).

O *Lactobacillus acidophilus* LA-5 é citado na produção de fermentados de leite por todo mundo estando dentre as diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*. O crescimento do seu uso é devido não possuir efeitos adversos no gosto, na aparência e palatabilidades dos produtos, e também sua capacidade de sobrevivência no produto até o consumo. O LA-5 sobrevive à passagem pelo estômago, é tolerante à acidez do estômago e também à bile e as enzimas digestivas. Os efeitos do consumo de *Lactobacillus acidophilus* são o balanceamento da flora intestinal, a redução da diarreia, a melhoria na digestão de lactose e a redução do colesterol (LEE; SALMINEN, 2009).

### 1.3.2 *Saccharomyces boulardii*

Desde o ano de 1950, na Indochina, a *S. boulardii* tem sido usada como probiótico. Foi primeiramente isolada de frutas silvestres (*Lychee*), com finalidade de equilibrar a microbiota intestinal e com fins terapêuticos no tratamento de diarreias (RASIC,

1983; TRIVEDI; JACOBSON; TESCH, 1986).

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura termotolerante (cresce na temperatura de 37°C), não patogênica e muito utilizada na medicina humana (McFARLAND; BEMASCONI, 1993).

Com estudos “in vitro” foi apresentado que a *Saccharomyces boulardii* apresenta papel de proteção contra alguns patógenos que provocam a diarreia (CZERUCKA e RAMPAL, 2002; MANSOUR-GHANAIE et al., 2003). E alguns trabalhos citam propriedades probióticas da levedura *Saccharommyces boulardii*, que foram estudadas em infecções experimentais.

Foi constatado que a terapia com *Saccharomyces boulardii* melhora significativamente a bioestrutura das fezes de pacientes com diarreia crônica idiopática e não influencia sobre a microbiota das fezes em indivíduos saudáveis (SWIDSINSKI et al., 2010). Surawicz et al., (2000) afirmam que para tratar pacientes com reincidência de diarreia associada à *Clostridium difficile*, a *Saccharomyces boulardii* tem sido muito utilizada.

#### **1.4 Carboximetilglucana (cmg)**

A carboximetilglucana é obtida através da solubilização da  $\beta$ -glucana, que em *Saccharomyces cerevisiae* é composta de resíduos de glicopiranosil  $\beta$ 1-3 e  $\beta$ 1-6 (KLIS et al., 2002).

As beta-glucanas presentes no farelo de aveia, cevada e no *Psillyum* são as fibras responsáveis pela diminuição do colesterol, e por terem sido estudadas receberam a aprovação da Food and Drug Administration, que autorizou a declaração de alimento benéfico a saúde. A porção adequada para possivelmente reduzir o risco de doenças de coração nos alimentos é de pelo menos 0,75g de beta-glucanas/porção e 1,7g de *Psillyum* (FDA,2001).

Capazes de atuar como estimulantes da atividade imunológicas no hospedeiro estão as  $\beta$ -glucanas polímeros de glicose, componentes estruturais da parede celular de leveduras. É através das células imunocompetentes e ou seus mediadores químicos que ocorre a ativação do sistema imune (BROWN, GORDON, 2003; KO, LIN, 2004; KIN et al., 2006).

Os derivados da  $\beta$ -glucana pertencentes a uma das mais abundantes classes de biopolímeros são os que mais podem contribuir para a prevenção e terapia do câncer (MIADOKOVÁ et al., 2005).

Na prevenção de lesões no DNA a carboximetilglucana (CMG), sulfoetilglucana (SEG) e carboximetilquitinagluca (CMGG) comprovaram sua eficácia. Nas

células pulmonares de hamsters V79 o efeito preventivo da CMG revelou maior eficiência nas quantidades dos danos ao DNA, sendo que a SEG e CMGG foram também eficientes, mas em menor grau que CMG. Segundo estudos, a prevenção ocorre pela reação da  $\beta$ -glucana com os radicais OH-, liberados na biotransformação do peróxido de hidrogênio (SLAMENOVÁ et al., 2003).

### 1.5 Polidextrose

Devida à capacidade de imitar algumas das propriedades que a gordura confere aos alimentos, o grupo de substitutos é classificado como *fat mimetics*. Fornecem até 4 kcal/g ou são isentos de valor calórico por não serem metabolizáveis como a celulose. São derivados de carboidratos como a celulose, extrinas, maltodextrinas, polidextrose, gomas, fibras e amidos modificados (ADA, 2005; MONTEIRO et al., 2006).

A polidextrose é considerada com um alimento funcional, é parcialmente fermentada no intestino grosso, mas não é digerido nem absorvido no intestino delgado (PFIZER, 1978). A polidextrose é um polissacarídeo sintetizado pela polimerização randômica da glicose (STUMM; BATLES, 1997), De acordo com Jie, (2000) este polímero é extremamente estável, incolor e não apresenta sabor residual, sendo também altamente estável dentro de uma faixa ampla de pH, temperatura, condições de processamento e estocagem. A polidextrose pode ser também considerada como pré-biótico, pois estimula o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias e a fermentação contínua ao longo do cólon (JIE et al., 2000).

Segundo Setser (1992), a polidextrose possui a capacidade de manter a umidade do produto e agir como um agente de volume proporcional a sua utilização como substituto de açúcar e gordura nos alimentos, isso sem comprometer a textura e o paladar, proporcionando cremosidade. A polidextrose é um polímero de condensação incerta da d-glucose com algumas unidades de sorbitol e um ácido resistente à ação das enzimas digestivas e fornece 1kcal/g.

A polidextrose é considerada pela legislação brasileira como um aditivo com função de espessante, agente de massa, estabilizante e veículo de adoçantes dietéticos (BRASIL, 1999).

## 2 OBJETIVOS

**Objetivo Geral:** Desenvolver uma bebida à base de extrato hidrossolúvel de soja, soro de queijo e manoproteína, fermentada por *Lactobacillus acidophilus* La5, adicionada de *Saccharomyces boulardii*.

### **Objetivos Específicos:**

- Desenvolver a tecnologia de produção da bebida;
- Determinar a composição proximal da bebida;
- Verificar a estabilidade da bebida no armazenamento: aspectos físico-químicos e microbiológicos;
- Verificar a aceitabilidade e interesse de consumo da bebida, através da análise sensorial.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K. E.; TAMINE, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minasfrescal cheese whey. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p.311-316, 2008.

American Dietetic Association. ADA. Position of the American Dietetic Association: fat replacers. **Journal of the American Dietetic Association** , 105:266-75, 2005.

ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e de inulina**. 2007. 54 f. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução no 386, de 05 de agosto de 1999.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, Massachusetts, v. 19, n. 3, p. 311-315, 2003.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1788-1795, 1999, out.1999.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 920-929, set./out., 2006.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**., v. 4, 2002, p. 733-739.

DHINGRA, S.; JOOD, S. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 479-488, 2001.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.

FDA - Food and Drug Administration. Food labeling: Health claims; soy protein and coronary heart disease. **Federal Register**, v.64, n. 206, p.57700-57733, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes: proposed definition of dietary fiber. Washington: National Academy Press, 2001. p.1-64.

GEORGE, P.; KASAPIS, S.; BANNIKOVA, A.; MANTRI, N.; PALMER, M.; MEURER, B.; LUNDIN, L. Effect of high hydrostatic pressure on the structural properties and bioactivity of immunoglobulins extracted from whey protein. **Food Hydrocolloids**., vol.32, 286-293, 2013.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.4-5, p.139-157, 1999.

GONÇALVES, M. M., Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo quark simbiótico, (Dissertação de mestrado), Viçosa, 2009.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR., G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2669-2673, 2001.

HASLER, C. M. Functional foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion. **Food Technology**, v.52, p.63-68, 1998.

HERNÁNDEZ, L. B.; RECIO, I.; AMIGO, L.  $\beta$ -lactoglobulin as Source of Bioactive Peptides. **Journal Amino Acids**, v. 35, n.2, p. 257-265, 2008.

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

JIE, Z. et al. Studies on the effects on the polidextrose intake on physiologic functions on Chinese people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 6, p. 1503-1509, 2000.

KANDLER, O.; WEISS, N. 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. and HOLT, J. G. (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins.

KIM, S. Y.; SONG, H. J.; LEE, Y. Y.; CHO, K. H.; ROH, Y. K. Biomedical issues of dietary fiber  $\beta$ -glucan. **Journal Korean of Medical Science**, Coréia, v. 21, p.781- 789, 2006.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.

KO, Y. T.; LIN, Y. L. 1,3- $\beta$ -Glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3313-3318, 2004.

KOMATSU, T.R. BURITI, F.C.A. SAAD; S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira Ciência Farmacêuticas**, vol.44. n3.,2008.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.7, p.1149-1160, 1979.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S., **Handbook of probiotics and prebiotics**, 2. ed. New Jersey, Ed. Wiley, 2009.

LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 10, p. 1589-1592, 1998.

LIU, K. **Soybeans chemistry, technology and utilization**. Gaithersburg: Aspen Publisher,

532 p., 1999.

MANSOUR-GHANAEL, F.; DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K.; SHAFAGHI, A. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. **World Journal Gastroenterology**, v. 9, 2003, p. 1832-1833.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v.47, n.3, p. 195-203, 1994.

MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 6, 1993, p. 157-171.

MCMINDES, M. K. Applications of isolated soy protein in low-fat meat products. **Food Technology**, v. 45, n. 12, p. 61-64, 1991.

MESSINA, M.; MESSINA, V. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 91, n. 7, p. 836-840, 1991.

MIADOKOVÁ, E.; SVIDOVÁ, S.; VLCKOVÁ, V.; DÚHOVÁ, V.; PRAZMÁRIOVÁ, E.; TOTHOVÁ, K.; NAĐOVÁ, S.; KOGAN, G.; RAUKO, P. The role of natural biopolymers in genotoxicity of mutagens/ carcinogens elimination. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, v. 149, n. p. 493-496, 2005.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. Valor nutritivo e funcional da soja. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v. 15, n. 2, p. 306-315, 2000.

O'SULLIVAN, G.C. Probiotics. **British Journal of Surgery**, v. 88, p. 161-162, 2001.

PFIZER Inc. **Polidextrose food additive petition**. New York: Pfizer Inc, 1978. (FDA petition 9A3441.)

RASIC, J. L. The role of dairy foods containing bifido and acidophilus bacteria in nutrition and health. **North European Dairy Journal**, v. 4, p. 80-88, 1983.

RIBEIRO, P. E.; MORAES, C. A. M.; ROIG, M. S. Utilização de misturas de extrato hidrossolúvel de soja com leite de vaca para fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.42, p.9-14, 1987.

STUMM, I.; BATTLES, W. Analysis of the linkage positions in polydextrose by the reductive cleavage method. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 291-297, 1997.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SANTOS, M.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, 2011.

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.

SETSER CS, Racette W. Macromolecule replacers in food products. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, p.275-297,1992.

SGARBIERI, V.C., Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, n.1, p.1-11, 1996.

SLAMENOVÁ, D.; LÁAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1 - 3)- $\beta$ -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, v. 198, n. 2, p. 153-160, 2003.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; DE SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.8, p.1454-1459, 1996.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins- From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, n.18, v.7, p.695-704, 2008.

SURAWICZ, C. M.; MACFARLAND, L. V.; GREENBERG, R. N.; RUBIN, M.; FEKETY, R.; MULLIGAN, M. E.; GARCIA, R. J.; BRANDMARKER, S.; BOWEN, K.; BORJAL, D.; ELMER, GW. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. **Clinical Infections Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1012-1017, 2000.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 491-496, 1998.

STEIJNS J.M., HOOIJDONK A.C.M.V. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **British Journal of Nutrition**, v.84, Suppl. 1, p.11±17, 2000.

SWIDSINSKI, A.; BAUCKE, V. L.; KIRSCH, S.; DOERFFEL, Y. Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting área, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34. p. 79-92, 2010.

TAMIME, A.; MARSHALL, V.; ROBINSON, R. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.151-187, 1995.

TAVARES, G. M.; PITANGA, K. C.; SILVA, M. A. T.; MORAIS, A. A. C. A soja como alimento funcional na prevenção do câncer. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 15, n. 2, p. 321-325, 2000.

TRIVEDI, N. B.; JACOBSON, G.; TESCH, W. Baker's Yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 75-109, 1986.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18 p. 714-728, 2008.



WEETAL, H. H.; HAVEWALA, N. B.; PITCHER, W. H.; DETAR, C. C.; VAN, W. P.; YAUVERBAUM, S. The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. **Biotechnology and Bioengineering**, v.16, n.3, p.295-313, 1974.

WIT, J.N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.

WONG, D. W. S.; CAMIRANT, W. M.; PAVLATH, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal American Dietetic Association**, v. 91, n. 7, p. 828-835, 1991.

### 3 ARTIGO

## DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA E SORO DE QUEIJO, FERMENTADA COM *Lactobacillus acidophilus* E ADICIONADA DE *Saccharomyces boulardii* E CARBOXIMETILGLUCANA

Paola da Silva Fonseca<sup>1\*</sup>, Raul Jorge Hernan Castro Gomez<sup>2</sup>

### RESUMO

A demanda por alimentos saudáveis e nutritivos vem impulsionando o desenvolvimento de novos produtos. A busca ainda por alimentos naturais, com inclusão de micro-organismos probióticos, tanto leveduras como bactérias, tem sido, nos últimos anos, o objetivo de varias pesquisas e também motivado o desenvolvimento deste tipo de novos produtos por parte das indústrias com um apelo à saúde com uma boa aceitação por parte dos consumidores que levam uma vida ativa e procuram uma situação de bem-estar. O objetivo deste trabalho foi a elaboração de uma bebida utilizando extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo, fermentada com cultura probiótica e adição de *Saccharomyces boulardii* e carboximetilglucana fornecendo ao novo produto características antidiarreicas e imunomoduladoras. A estabilidade do produto no armazenamento em geladeira (5°C-7°C) foi definida pela contagem de *Lactobacillus acidophilus* e *Sacharomyces boulardii*, bem como, determinações de pH e acidez. A composição proximal do novo produto foi determinada utilizando as técnicas analíticas preconizadas pelo Instituto Adolfo Lutz e AOAC. A bebida apresentou-se estável com contagens de *Lactobacillus acidophilus* superior a 7 log UFC/mL e contagens de *Saccharomyces boulardii* superior a 8 log UFC/mL ao longo de 35 dias de armazenamento nas condições mencionadas acima. O teor de proteínas foi de 1,05 %, umidade 78,23 %, cinzas 1,25 %, lipídios 0,00 % e 19,47 % de carboidratos. Assim, setenta (70) provadores não treinados utilizaram uma escala hedônica de 9 pontos e interesse de compra do produto Os resultados demonstraram que a bebida teve excelente aceitação pelos julgadores principalmente nos atributos sabor 99,98 %, aparência 95,66 % e aroma 92,70 %.

**Palavras-chave:** *Glycine max*. Probióticos. Micro-organismos.

<sup>1</sup>Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, UNOPAR. E-mail: fonseca.paola@gmail.com

<sup>2</sup>Docente da UNOPAR. E-mail: rcastrog@yahoo.com

\*Autor para correspondência

## ABSTRACT

The demand for healthy and nutritious foods has been driving the development of new products. The search for natural foods, including probiotic microorganisms, both yeast and bacteria, has been the objective of several researches in recent years and also motivated the development of this type of new products by the industries with a health appeal with a good Acceptance by consumers who lead an active life and seek a welfare situation. The objective of this work is the elaboration of a beverage using water soluble soybean extract and cheese serum, fermented with probiotic cultures and addition of Carboxymethylglucan and *Saccharomyces boulardii*, providing the new product with immunomodulatory and anti-diarrheal characteristics. Thus, seventy (70) untrained tasters used a hedonic school of 9 points and interest in purchasing the product. The stability of the product in the refrigerator storage (5°C-7°C) was defined by the count of *Lactobacillus acidophilus* and *Sacharomyrres boulardii*, as well as, determinations of pH and acidity. The centesimal composition of the new product was determined using the analytical techniques recommended by the Instituto Adolfo Lutz and AOAC. The beverage was stable with counts of *L. acidophilus* greater than 7 Log CFU / mL and counts of *S. boulardii* greater than 8 Log CFU / mL over 35 days of storage under the conditions mentioned above. The protein content was 1.05%, moisture 78.23%, ashes 1.25%, lipids 0.00% and 19.47% carbohydrates. The results showed that the beverage had excellent acceptance mainly in the attributes 99.98% taste, appearance 95.66% and aroma 92.70%.

**Keywords:** *Glycine max*. Probiotics. Microorganisms.

## 1 INTRODUÇÃO

O grão de soja é um produto rico em proteínas de alta qualidade e seus derivados tem se revelado veículos apropriados de culturas probióticas. O grão de soja contém oligossacarídeos como a rafinose e a estaquiose que não são digeridos pelos humanos, porém são metabolizados por bactérias probióticas (LIENER, 1994).

Pelas características nutricionais do grão de soja, pelo elevado teor de proteínas, pelo teor de minerais e fibras, a quantidade reduzida de gordura saturada e ausência de colesterol faz com que a relação entre o consumo desse produto e a saúde humana seja amplamente investigada (GRIESHOP; FAHEY, 2001; MORAIS; SILVA, 2000; YOUNG, 1991).

O soro de queijo é obtido durante a fabricação de queijo. Ocorre retenção de 55% dos nutrientes presentes no leite. Pode ser produzido através da ação enzimática ou ácida dando origem a dois tipos de soro, o ácido (pH<5) e o soro doce (pH> 6-7). O soro ácido, em geral, contém mais cinzas e um menor teor proteico do que o soro doce, tornando-se mais limitado seu uso na alimentação humana devido ao gosto ácido e ao elevado teor salino (WEETAL et al., 1974; KOSIKOWSKI, 1979; MAWSON, 1994; SISO, 1996).

Reparação celular, construção e reparação de músculos e ossos, energia para quem pratica atividades físicas e outros benefícios ligados a processos metabólicos do corpo, como atividade imunoestimulante, são as principais funções biológicas das proteínas do soro do leite bovino, protegendo também o sistema cardiovascular e modulando a atividade antimicrobiana e antiviral (SGARBIERI, 2005; HARAGUCHI et al., 2006).

Atualmente, probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

A combinação de bactérias probióticas e de substâncias prebióticas são referências dos simbióticos, que tem por objetivo afetar benéficamente o hospedeiro melhorando a sobrevivência e implantação de micro-organismos vivos no sistema digestivo e também por favorecer seletivamente o crescimento ou atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde no cólon (O’SULLIVAN, 2001; ARAUJO, 2007).

Por possuir alta capacidade de adesão ao epitélio intestinal, onde desempenha importante papel melhorando a digestibilidade de produtos lácteos o *Lactobacillus acidophilus* são os mais recomendados como suprimento dietético e diminuem, também, os níveis de colesterol no sangue por sua co-precipitação com sais biliares e controle preventivo de infecções intestinais (GONÇALVES, 2009).

O *Lactobacillus acidophilus* LA-5 é citado na produção de fermentados de leite por todo mundo estando dentre as diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*. O crescimento do seu uso é devido não possuir efeitos adversos no gosto, na aparência e palatabilidades dos produtos, e também sua capacidade de sobrevivência no produto até o consumo. O LA-5 sobrevive à passagem pelo estômago, é tolerante à acidez do estômago e também à bile e às enzimas digestivas. Os efeitos do consumo de *Lactobacillus acidophilus* são o balanceamento da flora intestinal, a redução da diarreia, a melhoria na digestão de lactose e a redução do colesterol (LEE e SALMINEN, 2009).

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura termotolerante (cresce na temperatura de 37°C), não patogêna e muito utilizada na medicina humana (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993)

Foi constatado que a terapia com *S. boulardii* melhora significativamente a bioestrutura das fezes de pacientes com diarreia crônica idiopática e não influencia sobre a microbiota das fezes em indivíduos saudáveis (SWIDSINSKI et al, 2010). Surawicz et al.(2000) afirmam que para tratar pacientes com reincidência de diarreia associada à *Clostridium difficile*, a *Saccharomyces boulardii* tem sido muito utilizada.

A carboximetilglucana é obtida através da solubilização da  $\beta$ -glucana, que em *Saccharomyces cerevisiae* é composta de resíduos de glicopiranosil  $\beta$ 1-3 e  $\beta$ 1-6 (KLIS et al., 2002) e apresenta atividades imunomoduladores e sobre o envelhecimento celular (MAGNANI, CASTRO-GÓMEZ, 2008; ARAUJO et al., 2015).

Capazes de atuar como estimulantes da atividade imunológicas no hospedeiro estão as  $\beta$ -glucanas polímeros de glicose, componentes estruturais da parede celular de leveduras. É através das células imunocompetentes e/ou seus mediadores químicos que ocorre a ativação do sistema imune (BROWN, GORDON, 2003; KO, LIN, 2004; KIN et al., 2006).

A polidextrose é considerada como um alimento funcional, é parcialmente fermentada no intestino grosso, mas não é digerido nem absorvido no intestino delgado (PFIZER, 1978). A polidextrose é um polissacarídeo sintetizado pela polimerização randômica da glicose (STUMM; BATLES, 1997), De acordo com Jie, (2000) este polímero é extremamente estável, incolor e não apresenta sabor residual, sendo também altamente estável dentro de uma faixa ampla de pH, temperatura, condições de processamento e estocagem. A polidextrose pode ser também considerada como pré-biótico, pois estimula o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias e a fermentação contínua ao longo do cólon (JIE et al., 2000).

Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma bebida à base de

extrato hidrossolúvel de soja, soro de queijo e manoproteína, fermentada por *Lactobacillus acidophilus* La5, adicionada de *Saccharomyces boulardii*, além de desenvolver a tecnologia de produção e determinar a composição proximal da bebida, sua estabilidade no armazenamento e realizar análise sensorial visando verificar a aceitabilidade da bebida.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

A fabricação da bebida e as análises foram realizadas nos laboratórios do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, na Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) – Campus Piza, Londrina PR.

### **3.1 Produção do extrato hidrossolúvel de soja**

O extrato de soja foi obtido utilizando os grãos de soja da variedade BRS 257 doados pela empresa Sementes Paraná- Mauá da Serra- PR.

Inicialmente, 1,0 Kg de grãos foi lavado com 4,5 L de água fervente por 5 minutos com o objetivo de separar os grãos das macro impurezas utilizando uma peneira. Aos grãos assim tratados foram adicionados 4,5 L de água e deixados por 10 minutos depois de atingido o ponto de ebulição. Após este procedimento, os grãos, junto com a água, foram triturados em liquidificador por 3 minutos. A suspensão obtida foi filtrada através de pano de dessora, separando assim o sobrenadante do precipitado, constituindo, assim, o extrato hidrossolúvel de soja.

### **2.2 Produção do inóculo de *Lactobacillus acidophilus***

Aproximadamente 50 mg da cepa liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen) foram adicionadas assepticamente a 10 mL de leite em pó desnatado (10% p/v), esterilizado a 105°C por 10 minutos e incubada a 37°C por 24 horas. Após este período, os 10 mL do leite incubado foram adicionados assepticamente em 100 mL de leite em pó desnatado (10% p/v), esterilizado a 105°C por 10 minutos e incubados a 37°C por 24 horas. Completado as 24 horas, 10 mL do cultivo foram retirados assepticamente e adicionados a um volume de 100 mL de extrato hidrossolúvel de soja, pasteurizado (75°C/15 min.) e incubado a 37°C por 24 horas.

### **2.3 Produção do inóculo de *Saccharomyces boulardii***

A *Saccharomyces boulardii*, mantida em tubo de Agar inclinado de Batata Dextrose (4,0 g extrato de batata; 20,0 g dextrose; 15,0 g agar), foi cultivada em Erlenmeyers de capacidade 250 mL, contendo sacarose, 10%, peptona, 10% e sulfato de amônia 2,5 %, esterilizado a 121°C por 15 minutos e incubada a 30°C por 24-48 horas sob agitação de 180 rpm. Passando o tempo desejado com a levedura já cultivada, o conteúdo do Erlenmeyer foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado em 5.000 rpm por 5 minutos para se obter a massa celular da levedura.

#### **2.4 Obtenção da carboximetilglucana (CMG)**

A CBG foi obtida de  $\beta$ -glucana insolúvel extraída da parede celular de *S. cerevisiae*. Para isto, a massa de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* foi autolisada a 55°C durante 24 h. Após este processo, a massa celular da levedura foi separada por centrifugação (3.000 g / 6 min) e lavada com água destilada a 95°C durante 9 a 12 horas. Novamente, os sólidos foram separados por centrifugação nas mesmas condições anteriores e tratados com Hidróxido de Sódio 1,0 N a 60°C por 1 hora. A seguir, o material foi novamente centrifugado nas mesmas condições acima mencionadas e os sólidos obtidos, que correspondem a  $\beta$ -glucana insolúvel, foram lavados com água até obter uma massa com pH neutro.

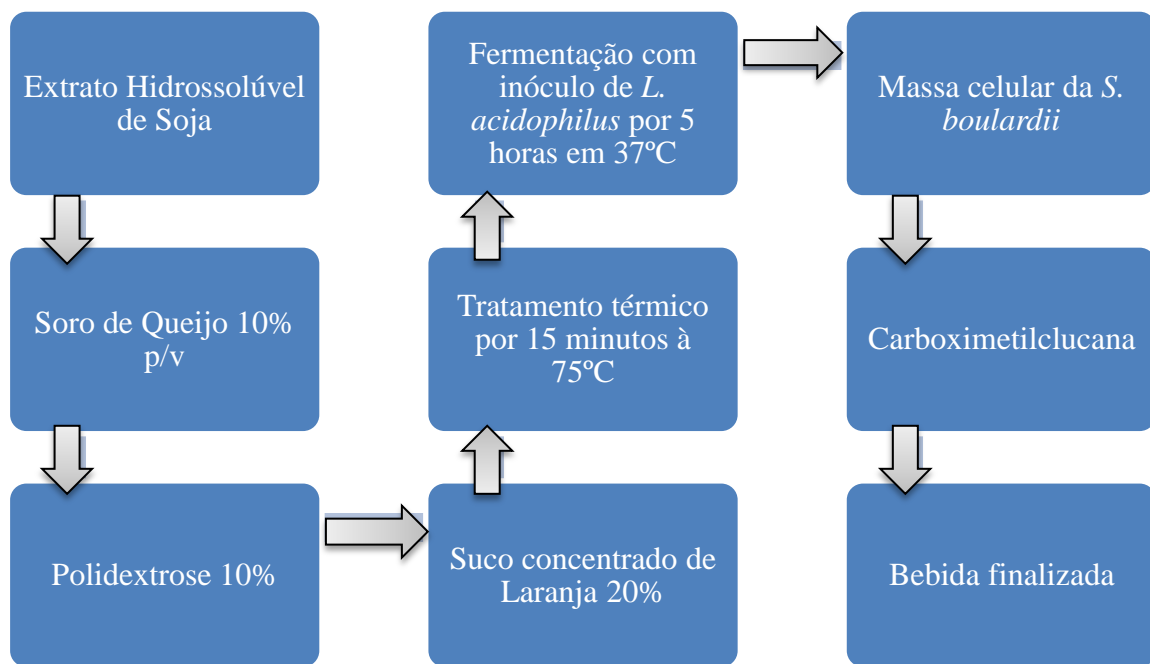
Para a solubilização das  $\beta$ -glucanas, esta foi misturada com isopropanol e mantida sob agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente (25°C-30°C). Em seguida, adicionou-se lentamente NaOH 30%, permanecendo sob agitação por mais 90 minutos. Transcorrido esse período, adicionou-se ácido monocloroacético à mistura, a qual permaneceu em baixa agitação e a 65°C por 5 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 3.000 g durante 5 minutos e o precipitado obtido foi dissolvido em suficiente água destilada para torna-se um gel e dialisado contra água à temperatura de 4°C durante 48 h, cuidando de trocar a água de diálise a cada 24 horas. Após este período o produto em forma de gel foi armazenado em geladeira até uso.

#### **2.5 Produção da bebida**

Para a formulação da bebida foi utilizado o extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo em pó (10% m/v), adicionado polidextrose e suco concentrado de laranja. Em seguida, a bebida foi submetida a tratamento térmico de 75°C por 15 minutos em banho-maria. Após o tratamento térmico, a bebida foi resfriada aproximadamente à 4°C com

banho de gelo, foi adicionado o inóculo de *Lactobacillus acidophilus*, de acordo com o preparo no item 3.2. Na fermentação, foram mantidos a uma temperatura média de 37°C por 5 horas. Ao atingir aproximadamente pH 4,7, a bebida foi complementada com a massa celular de *Saccharomyces boulardii*, e carboximetilglucana, envasadas em garrafas de material PET com capacidade de 50 mL e armazenadas em temperatura de  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Figura 1.** Fluxograma da produção da bebida.



Fonte: Do Autor.

### 3 ANÁLISES

#### 3.1 Análises físico – químicas

Foram feitas as determinações da composição proximal da bebida (proteína, umidade, cinzas, lipídeos), foram realizadas em triplicata, seguindo os métodos oficiais descritos na Instrução Normativa nº 68 (Brasil, 2006).

O teor de proteína foi realizado pelo método micro-Kajeldahl, para a caracterização das matérias primas.

A análise de umidade foi feita utilizando 5 mL da amostra misturada a 10g de areia tratada (J.T.Backer) com auxílio de bastão de vidro em cápsula de porcelana. O conjunto (amostra, areia, bastão e cápsula) foi pesado em balança analítica e deixado a 105°C em estufa até peso constante.



A análise de cinzas foi feita com as amostras previamente secas com o auxílio do bico Buisen para reduzir a umidade ao ponto de evitar perda de amostra e o cadinho foi submetido à temperatura 550°C em mufla (Quimis, modelo 318, Londrina, Brasil).

O pH foi determinado segundo o método de Marshall (1993), por inserção direta do eletrodo do equipamento calibrado na amostra, utilizando aparelho DIGIMED (DM22, Londrina, Brasil).

A determinação de carboidratos foi realizada por diferença: 100 – (% umidade + % lipídeos + % proteínas + % cinzas).

### 3.2 Análises microbiológicas

A análise de *Salmonella* spp. foi realizada seguindo metodologia preconizada pela (AOAC, 2002) A análise de Coliformes Totais foi realizada através da técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo (RDC nº 12, 2001; SILVA, JUNQUEIRA E SILVEIRA, 1997).

Todas as técnicas utilizadas foram realizadas em triplicatas.

#### 3.2.1 Contagem de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen) na bebida.

As contagens de *L. acidophilus* foram determinadas, adicionando-se 1 mL da bebida em 90 mL de água peptonada (peptona de caseína 10,0 g; cloreto de sódio 5,0 g; hidrogenofosfato dissódico dodeca 9,0 g; dihidrogenio fosfato de potássio 1,5 g.), previamente esterilizada a 121°C por 15 minutos. Foram realizadas diluições seriadas, em água peptonada 0,1% (p/v), até a diluição 10<sup>-8</sup> e em seguida foi feito o plaqueamento por profundidade utilizando MRS Agar *Lactobacillus* (enzymatic digest of animal tissue 10 g; beef extract 10 g; yeast extract 5 g; dexdrose 20 g; sodium acetate 5 g; polysorbate 80 1 g; potassium phosphate 2 g; ammonium citrate 2 g; magnesium sulfate 0,1 g; manganese sulfate 0,05 g; agar 15 g) e incubado a 37°C, em anaerobiose por 48 horas, (MORTAZAVIANET al., 2007).

#### 3.2.2 Contagem de *Sacharomyces boulardii* na bebida.

A contagem de células de *Saccharomyces boulardii* foi determinada através da microscopia da câmara de Neubauer (Lee et al., 1981).

### **3.3 Análise sensorial**

A bebida foi submetida a um teste sensorial de aceitação utilizando um painel contendo 70 julgadores não treinados. No primeiro dia após a produção da bebida foram realizadas as análises microbiológicas a fim de verificar a inocuidade do produto e garantir a segurança dos julgadores. Os testes foram realizados em cabines individuais do Laboratório de Análise Sensorial da UNOPAR (Piza, Londrina), sob luz branca. Os atributos de aparência, aroma, sabor, textura e impressão global foram analisados por meio da utilização de uma ficha contendo uma escala hedônica com 9 pontos, onde 1 = desgostei muitíssimo e 9 = gostei muitíssimo. Para a avaliação, cada provador recebeu aproximadamente 30 mL da bebida em copo descartável, juntamente com 50 mL de água em um segundo copo descartável. A aprovação ética para este estudo foi obtida pelo Comitê de Ética da Universidade Norte do Paraná- (UNOPAR), Paraná, Brasil.

Após explicações dadas pelo responsável da pesquisa sobre o produto e os objetivos do estudo, todos os provadores receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde estava contida a explicação do objetivo do estudo, os riscos aos participantes em caso de intolerância a lactose ou restrição à alimentação com soja, entre outras informações, o qual foi assinado. (Apêndice 1).

Foi critério de inclusão dos participantes da análise sensorial ter idade entre 18 e 60 anos. Foram excluídas da pesquisa pessoas que não se enquadram na faixa etária estipulada, pessoas com restrição à soja e que não estavam dispostas a participar da análise sensorial.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Composição proximal da bebida**

Os resultados das análises de composição proximal da bebida estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** – Médias de três produções da composição proximal da bebida elaborada a base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo fermentada com *Lactobacillus acidophilus* e adicionada de *Saccharomyces boulardii*.

<b>Composição Proximal (%)</b>	
Proteína	1,05
Umidade	78,23
Cinzas	1,25
Carboidratos	19,47
Lipídeos	0,00
Total	100

**Fonte:** Da Autora.

O produto não apresenta gorduras e tem pouco teor de proteínas. O uso de polidextrose como substituto de açúcar (sacarose) permite seu consumo sem provocar aumentos de peso (não digerível), e assim é possível sugerir a bebida para ser consumida por pessoas que apresentem restrições de consumo de açúcares (pré-diabéticos). Segundo alguns estudos, a utilização da polidextrose como substituto de açúcar e gordura nos alimentos não compromete a textura e o paladar e, além do mais, proporciona cremosidade ao produto. A polidextrose é um polímero de condensação incerta da d-glucose com algumas unidades de sorbitol e um ácido resistente a ação das enzimas digestivas e fornece 1kcal/g (SETSER, 1992)

#### **4.2 Análises microbiológicas da bebida**

Os resultados das análises microbiológicas da bebida indicaram que esta se encontra isenta de micro-organismos patogênicos como *Salmonella* spp. e coliformes totais.

Sendo assim, a bebida está microbiologicamente adequada para o consumo humano e seus resultados estão em conformidade com os estabelecidos na resolução (RDC Nº12, 2 de janeiro de 2001), que estabelece Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e determina os critérios para a interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

### 4.3 Contagem de *Lactobacillus acidophilus* la-5 durante o armazenamento.

Os resultados das análises de contagem de *Lactobacillus acidophilus* presentes na bebida durante o armazenamento a 5°C-7°C estão indicados na tabela 2.

**Tabela 2-** Médias de três repetições da contagem de *Lactobacillus acidophilus* (UFC/mL) presentes na bebida durante o período de armazenamento de 35 dias a 5°C-7°C.

Populações	
Tempo (dias)	Contagem
1	1,4 x 10 <sup>7</sup>
7	5,0 x 10 <sup>7</sup>
14	1,1 x 10 <sup>8</sup>
21	8,0 x 10 <sup>8</sup>
35	2,7 x 10 <sup>8</sup>

Fonte: Do Autor.

Os resultados indicam que as contagens de *Lactobacillus acidophilus* no produto durante o período de armazenamento apresentaram um crescimento de pouco mais do que 1 ciclo logarítmico nos primeiros 21 dias do armazenamento e uma leve diminuição da população no dia 35 de armazenamento, sendo que, do ponto de vista microbiológica esta menor contagem não foi significativa já que os valores variaram dentro de um ciclo logarítmico. Esses valores estão de acordo com o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) relativo à concentração de microrganismos probiótico que devem estar presentes no produto para que suas propriedades funcionais sejam manifestadas, ou seja, o produto deve apresentar contagens acima de 10<sup>6</sup> UFC/mL ou g.

### 4.4 Contagem de *saccharomyces boulardii* durante o armazenamento

Os resultados das análises de contagem da levedura *Saccharomyces boulardii* na bebida estão indicados na tabela 3.

**Tabela 3-** Médias de três repetições da contagem de *Saccharomyces boulardii* (UFC/mL) presentes na bebida durante o período de armazenamento de 35 dias a 5°C-7°C.

<b>Populações</b>	
<b>Tempo (dias)</b>	<b>Contagem</b>
1	$9,0 \times 10^7$
7	$1,6 \times 10^8$
14	$7,0 \times 10^8$
21	$8,5 \times 10^8$
35	$8,3 \times 10^8$

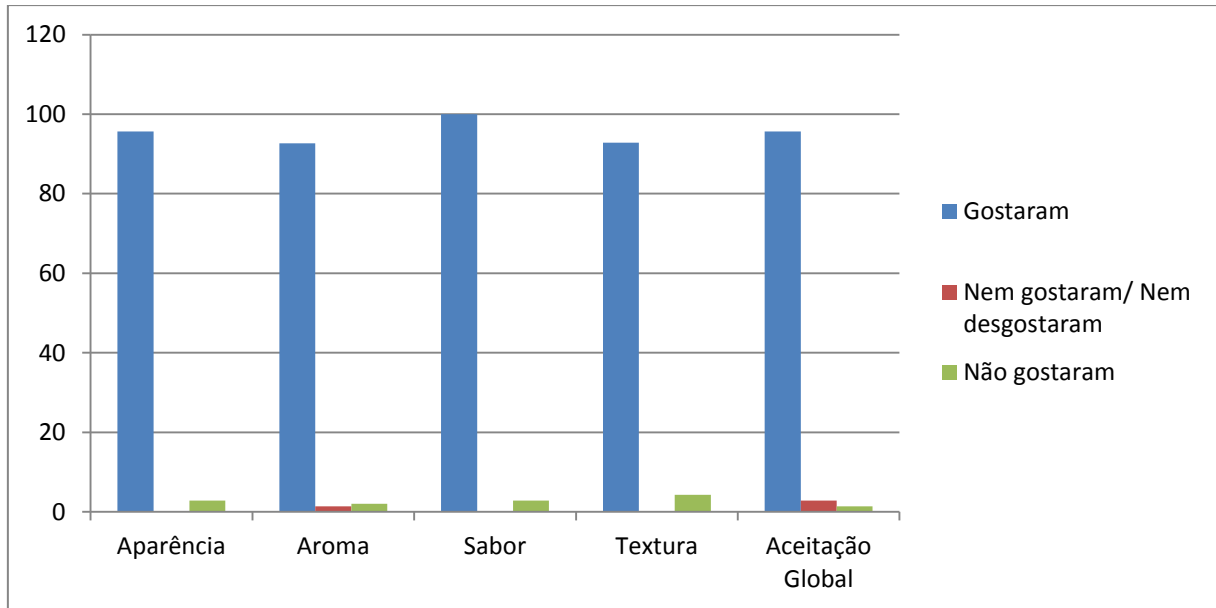
**Fonte:** Do Autor.

Os resultados indicam que, do ponto de vista microbiológico, a levedura *Saccharomyces boulardii* manteve sua contagem estável com um leve crescimento da população dentro de um ciclo logarítmico praticamente durante todo o armazenamento.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) que especifica como critério para que um produto seja considerado um alimento probiótico com propriedades funcionais correspondentes, as contagens devem ser de  $10^6$  UFC/mL ou g.

#### **4.5 Resultado da análise sensorial**

Os resultados da análise sensorial com seus respectivos atributos se encontram na figura 1. Os resultados do interesse de compra da bebida estão na figura 2.

**Figura 1-** Aceitabilidade da bebida.

Fonte: Da Autora.

De acordo com o gráfico 1, a bebida teve grande aceitação pelos julgadores, nos atributo aparência, aroma, sabor, textura com aprovação de 95,66 %, 92,70 %, 99,98 % e 92,84 %, respectivamente. Como consequência desta avaliação, 95,69 % dos julgadores aprovaram o produto.

**Figura 2-** Intenção de compra da bebida.

Fonte: Da Autora.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o extrato hidrossolúvel de soja mostrou grande potencial como base para o desenvolvimento de bactérias probióticas permitindo sua caracterização como produto probiótico. O *Lactobacillus acidophilus* LA-5 se adaptou de forma notável no extrato hidrossolúvel de soja apresentando crescimento e contagens de acordo com as exigências das agências reguladoras (ANVISA) e seu processo de fermentação na produção da bebida contribuiu para melhorar notoriamente o sabor e aroma do extrato hidrossolúvel de soja. Isto se verificou na análise sensorial da bebida. Os resultados obtidos permitiram concluir que a bebida manteve suas características probióticas por todo seu período de armazenamento com contagens da ordem de  $7 \log$  UFC/mL. A polidextrose utilizada no lugar da glicose se mostrou um substituto viável e estável para o desenvolvimento de novos produtos como adoçante. Dessa forma, a bebida desenvolvida para este estudo teve excelente aceitação dos participantes da análise sensorial com um elevado interesse de compra.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. A. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus Delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina. 2007. 54 f. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- ARAÚJO V. B. S, MELO E. N. F, SOUZA N. T, SILVA. V. M .B, CASTRO-GOMEZ, R.J.H, SILVA.A.S, SOUZA E.L, and MAGNANI. M . Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men, **Molecules**, 20, 2015.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, Massachusetts, v. 19, n. 3, p. 311-315, 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001.
- Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes: proposed definition of dietary fiber. Washington: National Academy Press, 2001. p.1-64.
- GONÇALVES, M. M., Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo quark simbiótico, **Dissertação de mestrado**, Viçosa, 2009.
- GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR., G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. *J. Agric. Food Chemistry*, v. 49, n. 5, p. 2669-2673, 2001.

- JIE, Z. et al. Studies on the effects on the povidextrose intake on physiologic functions on Chinese people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 6, p. 1503-1509, 2000.
- KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.
- KO, Y. T.; LIN, Y. L. 1,3- $\beta$ -Glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3313-3318, 2004.
- LENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 34, p. 31-67, 1994.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.  $\beta$ -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.3, p.631-649, 2008.
- MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: **A review of an innovative biotherapeutic agent**. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v. 6, 1993, p. 157-171.
- MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. Valor nutritivo e funcional da soja. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica.**, v. 15, n. 2, p. 306-315, 2000.
- O'SULLIVAN, G.C. Probiotics. **British Journal of Surgery**, v. 88, p. 161-162, 2001.
- PFIZER Inc. **Polidextrose food additive petition**. New York: Pfizer Inc, 1978. (FDA petition 9A3441.)
- SGARBIERI, V.C., Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, n.1, p.1-11, 1996.
- SURAWICZ, C. M.; MACFARLAND, L. V.; GREENBERG, R. N.; RUBIN, M.; FEKETY, R.; MULLIGAN, M. E.; GARCIA, R. J.; BRANDMARKER, S.; BOWEN, K.; BORJAL, D.; ELMER, G.W. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. **Clinical Infections Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1012-1017, 2000.
- SWIDSINSKI, A.; BAUCKE, V. L.; KIRSCH, S.; DOERFFEL, Y. Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34. p. 79-92, 2010.
- WEETAL, H. H.; HAVEWALA, N. B.; PITCHER, W. H.; DETAR, C. C.; VAN, W. P.; YAUVERBAUM, S. The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. **Biotechnology and Bioengineering**, v.16, n.3, p.295-313, 1974.
- YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal American Dietetic Association**, v. 91, n. 7, p. 828-835, 1991.



## APÊNDICE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Nome do Participante:.....  
 Documento de Identidade nº:..... Sexo: ( ) M ( ) F  
 Data de Nascimento:...../...../..... Telefone:.....  
 Endereço:.....n.º.....Apto:.....  
 Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....

#### II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Desenvolvimento de uma bebida a base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo fermentada com *Lactobacillus acidophilus* complementada com *Saccharomyces boulardii* e carboximetilglucana.**

///

Pesquisador (a): Paola da Silva Fonseca – Discente (Responsável pelo desenvolvimento da pesquisa)  
 Raul J. H. Castro Gómez - Docente (professor orientador da pesquisa).

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA (Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).

Risco Nulo ( ) Risco Mínimo ( x ) Risco Médio ( ) Risco Baixo ( ) Risco Maior ( )

- **Possui risco para pessoas intolerantes a lactose, alérgicas a proteína de leite de vaca ou que possuem restrição médica aos ingredientes soja e probióticos.**

3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.

- **Pessoas intolerantes a lactose, alérgicas a proteína de leite de vaca ou que possuem restrição médica aos ingredientes soja e probióticos não poderão participar da análise sensorial.**

#### III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE SOBRE A PESQUISA

Estamos convidando você a participar da análise sensorial de bebida imunomoduladora elaborada com soja, soro de queijo, probióticos e carboximetilglucana no sabor laranja. Esse produto está sendo desenvolvido pela aluna de mestrado Paola da Silva Fonseca (Gastrônoma), sob orientação do Prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez (Dr. em Ciência de Alimentos), do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da Universidade Norte do Paraná, UNOPAR, unidade Piza. Caso você tenha interesse em participar, por favor, acomode-se junto a uma das cabines do Laboratório de Análise Sensorial da UNOPAR. A bebida imunomoduladora a ser avaliada nesta pesquisa possui em sua formulação: soja e soro de queijo. Esses ingredientes são utilizados em produtos disponíveis para consumo humano, ou seja, é de grau alimentício. Além disso, o produto foi adicionado de carboximetilglucana (molécula solúvel extraída da levedura *Saccharomyces cerevisiae*) e culturas probióticas (*Lactobacillus acidophilus LA-5* e *Saccharomyces boulardii*), que possui efeitos benéficos ao organismo humano, que foram comprovados através da realização de ensaios em humanos.

Os ingredientes utilizados na formulação base da bebida imunomoduladora são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e/ou pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), assim como a cepas de *Lactobacillus acidophilus LA-5* e *Saccharomyces boulardii* e a carboximetilglucana.

O produto foi desenvolvido e armazenado nos laboratórios do Mestrado em Ciência e Tecnologia de

Leite e Derivados da Universidade Norte do Paraná, UNOPAR, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos.

Foram realizadas análises microbiológicas do produto para a contagem das populações das culturas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Saccharomyces boulardii*) e para a contagem da população de contaminantes (*Coliformes totais*, *Salmonella spp*). É importante ressaltar que as análises microbiológicas de contaminantes foram realizadas apenas para verificar se algum desses microrganismos eventualmente se desenvolveu no produto, uma vez que a bebida imunomoduladora foi produzida de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos.

Para participar da pesquisa, você deve ter entre 18 e 60 anos, não apresentar nenhum tipo de manifestação de alergia, intolerância ou restrição aos constituintes da bebida. Atendendo a essas condições você poderá participar da pesquisa, sem qualquer desconforto ou risco esperado.

Assim, você terá a oportunidade de participar da análise sensorial, provando um alimento (bebida), dando sua opinião a respeito do produto. Você também estará participando da pesquisa de desenvolvimento de um novo produto, que objetiva a obtenção de um alimento semelhante ao convencional, porém, com alto teor de proteínas, propriedades probióticas e imunomoduladora, uma vez que são adicionados ingredientes que auxiliam na manutenção da saúde, prevenindo os riscos de aparecimento de doenças.

Você receberá uma amostra contendo 20 mL. Para expressar sua opinião sobre o produto, você utilizará uma ficha de avaliação.

#### **IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA**

Não haverá remuneração financeira para os participantes da análise. O provador poderá desistir de participar da análise a qualquer momento, sem nenhum ônus. Todas as informações pessoais serão sigilosas, garantindo a privacidade dos provadores. Caso o provador queira saber mais informações sobre o produto que está sendo desenvolvido e sobre os seus possíveis efeitos sobre a saúde, nosso grupo de pesquisa estará à disposição para dar explicações a respeito, e/ou fornecer literatura científica apropriada sobre o assunto e/ou disponibilizar o projeto de pesquisa enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, que contém maiores detalhes e informações técnicas sobre a análise sensorial a ser realizada.

#### **V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO**

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS. Universidade Norte do Paraná. Rua Marselha, 591, Jardim Piza – CEP: 86041-140- Londrina – PR. Telefone: (43) 3371-9849

PAOLA DA SILVA FONSECA. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados. Rua Marselha, 591, Jardim Piza – CEP: 86041-140-Londrina – PR. Telefone: (43) 3371-7834

RAUL JORGE HERNAN CASTRO GÓMEZ. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados. Rua Marselha, 591, Jardim Piza – CEP: 86041-140-Londrina – PR. Telefone: (43) 3371-7834

#### **VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

“Estou ciente do objetivo da análise, não apresento reação alérgica/intolerância ou restrição aos ingredientes, tenho entre 18 e 60 anos e aceito participar dessa análise.”

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.