UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

THIANA CLAUDIA FREIRE ESTEVES

INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO FERMENTADO E NÃO FERMENTADO DE SOJA PRETA SOBRE COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

RIO DE JANEIRO

2017

THIANA CLAUDIA FREIRE ESTEVES

INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO FERMENTADO E NÃO FERMENTADO DE SOJA PRETA SOBRE COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras: Verônica M. A. Calado

Ilana Felberg

Rio de Janeiro

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

EE791

Esteves, Thiana

Influência do processo de obtenção de extrato fermentado e não fermentado de soja preta sobre compostos bioativos e capacidade antioxidante / Thiana Esteves. -- Rio de Janeiro, 2017.

161 f.

Orientador: Veronica Calado.

Coorientador: Ilana Felberg.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2017.

1. Soja preta. 2. Extrato fermentado de soja preta. 3. Antocianinas. 4. Isoflavonas. 5. Atividade antioxidante. I. Calado, Verônica. II. Ilana, Felberg. III. Título.

INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO FERMENTADO E NÃO FERMENTADO DE SOJA PRETA SOBRE COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Thiana Claudia Freire Esteves

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por

_____

Verônica M. A. Calado, D.Sc. EQ-UFRJ (Orientadora)

_____

Ilana Felberg, D.Sc. EMBRAPA (Orientadora)

_____

Adriana Farah de Miranda Pereira, D.Sc. INJC-UFRJ

_____

Eduardo Henrique Miranda Walter, D.Sc. EMBRAPA

_____

Elisa Helena da Rocha Ferreira, D.Sc. UFRRJ

_____

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc. EQ-UFRJ

_____

Suely Pereira Freitas, D.Sc. EQ-UFRJ

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2017

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão”.

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que estiveram ao meu lado neste caminho. Agradeço especialmente:

À Deus pela minha vida, por todas as graças alcançadas, por tudo que tenho e principalmente por quem eu tenho.

À Nossa Senhora Aparecida, no seu jubileu de 300 anos, por sua paz, seu consolo, por ouvir minhas orações e interceder por mim junto ao Pai.

À minha orientadora Ilana Felberg por me aceitar como sua primeira aluna de doutorado; por partilhar comigo seus conhecimentos, rigor científico e ética na produção do conhecimento; por acreditar na minha capacidade de trabalho; por ter sido força nos momentos de fraqueza e certeza nas horas de dúvida; por tudo que nos uniu nesta missão a cinco anos atrás, por tudo que nos une hoje e por tudo que ainda nos unirá nesta estrada chamada vida. Você é muito importante para mim!

À minha orientadora Verônica Calado pelas contribuições certeiras no desenvolvimento desta pesquisa, por estar sempre pronta a ajudar (estando no Rio, em Recife ou na China), pelas trilhas sonoras das nossas reuniões, pela confiança, apoio e carinho.

À minha mãe Vera por estar sempre do meu lado de maneira única e insubstituível, por ser minha parceira, melhor amiga, por me cobrir de amor e abençoar a minha vida. Te amo, amada!

Ao meu pai Fernando por seu amor, apoio e incentivo em todos os momentos. Significam muito para mim. Te amo!

Ao meu amado marido Paulo Max que acompanhou o dia a dia desta jornada sempre me apoiando e incentivando a seguir em frente e conquistar meus objetivos. Juntos somos mais! A família já pode crescer!

Ao meu irmão, avós, padrinhos, tios (as), primos (as), comadre, afilhadas, sogros, cunhadas e sobrinha (que chegou em 2015 para alegrar nossa família), pela torcida e carinho, me sinto afortunada por fazer parte desta família.

Às minhas amigas Fabiana e Roberta pelas palavras de incentivo, ajuda na formatação da tese e por estarem presentes de forma tão especial e essencial na minha vida.

À amiga Roseli pelas orações e por cuidar de mim e da minha casa com tanto carinho, seu apoio foi muito importante para que eu concluísse este trabalho.

A todos os amigos de perto e de longe que torceram por mim e compreenderam a minha ausência em diveros momentos. Novos tempos virão.

Ao David Régis de Oliveira, técnico da planta de leguminosas da Embrapa, pela parceria e colaboração nas muitas etapas do trabalho.

À pesquisadora Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi pelo apoio, incentivo, carinho e especialmente por nos confiar o estudo do processamento da soja preta, um dos frutos da sua dedicação no desenvolvimento de cultivares mais adequadas ao consumo humano.

À pesquisadora Adelia Faria Machado (EMBRAPA-CTAA) por me orientar nas análises de atividade antioxidante, por disponibilizar seu tempo e conhecimento para o enriquecimento deste trabalho.

A grande e multidisciplinar equipe da Embrapa que disponibilizou seu tempo, conhecimento técnico e estrutura de laboratórios para que este trabalho fosse concretizado. A vocês Allan Wilhelm, Eduardo Walter, Filé (Sergio), Henriqueta Talita, Manuela Santiago, Ronoel Godoy, Rosemar Antoniassi, Rosires Deliza, Sidinéia Freitas, Sidney Pacheco, William Jr, o meu muito obrigada!

À professora Suely Freitas que orientou o meu estágio em docência na disciplina de Laboratório de Engenharia de Alimentos na EQ-UFRJ.

Aos professores e amigos do DTA-UFRRJ que me receberam de braços abertos na minha primeira experiência de docência, em especial à Sandra Gregório (minha primeira e eterna orientadora), Elisa Rocha, Mônica Pagani, Maria Ivone, André von Randow e Romulo Cardoso.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro e à Embrapa Agroindústria de Alimentos pela oportunidade de crescimento profissional e humano.

Minha gratidão!

RESUMO

ESTEVES, Thiana Claudia Freire. **Influência do processo de obtenção de extrato fermentado e não fermentado de soja preta sobre compostos bioativos e capacidade antioxidante.** Rio de Janeiro, 2017. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A soja preta é um grão de cultivo milenar no Oriente que, nas duas últimas décadas, tem atraído à atenção de pesquisadores e consumidores do Ocidente. Além de boa qualidade nutricional, a soja preta possui compostos bioativos, em especial isoflavonas e antocianinas, associados à atividade antidiabetes, antiobesidade, anticâncer, anti-inflamatória, hipolipidêmica e antimutagênica. Diferentemente das isoflavonas, as antocianinas estão presentes exclusivamente nas sojas de coloração preta, constituindo os pigmentos responsáveis pela cor da casca. Esses pigmentos são compostos instáveis que podem sofrer degradação pelo calor, luz e condições de pH. A produção de bebidas à base do extrato de soja preta apresenta-se como uma alternativa na oferta de alimentos de soja com potenciais benefícios à saúde. O presente trabalho visou avaliar a influência do processamento sobre o extrato de soja preta e o extrato fermentado de soja preta, desenvolvendo produtos com potencial promotor de saúde, por meio de processos que resultem em maior preservação desses compostos, especialmente de antocianinas. A condução deste estudo experimental foi realizada em três etapas: estudos preliminares para avaliar os processos tradicionais e alternativamente referenciados na literatura para obtenção de extrato de soja; estudo das etapas de processamento térmico durante a obtenção do extrato de soja preta visando à redução da perda de compostos bioativos; e estudo dos efeitos da fermentação do extrato de soja preta com *Lactobacilus acidophilus* (LA-5®) sobre seus compostos bioativos, atividade antioxidante e viabilidade das bactérias probióticas durante 28 dias de armazenamento a 8 ± 2 °C. Os resultados mostraram que os processos tradicionais de obtenção de extrato de soja utilizados para soja amarela não são adequados para os grãos de soja preta. O descarte de água durante o processo e o uso de condições de tempo

e temperatura (cozimento e tratamento de conservação) são prejudiciais à manutenção das antocianinas. A utilização do grão moído, o cozimento do extrato a 80 °C por 5 min, o aproveitamento da água de cozimento e o tratamento de pasteurização a 98 °C por 5 min foram as condições de processamento mais adequadas à obtenção do extrato de soja preta. A aceitação sensorial da bebida de soja preta formulada sabor chocolate foi similar a de uma bebida comercial orgânica. O extrato de soja preta fermentado com cultura probiótica apresentou redução de cerca de 20% no teor de antocianinas. No entanto, houve um aumento no teor de isoflavonas agliconas e a atividade antioxidante estimada foi superior quando comparada ao extrato não fermentado. As bebidas obtidas pela formulação do extrato fermentado de soja preta com açúcar e com diferentes preparados de fruta apresentaram boa aceitação sensorial pelos consumidores, com destaque para o sabor morango que recebeu média 7,6, correspondente a “gostei muito” em escala hedônica de nove pontos. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as bebidas de soja preta são produtos com potencial para promover o consumo de soja preta no mercado Ocidental.

Palavras-chave: Soja preta, extrato de soja preta, extrato fermentado de soja preta, antocianinas, isoflavonas, atividade antioxidante, probióticos, aceitação sensorial.

ABSTRACT

ESTEVES, Thiana Claudia Freire. **Influence of fermented and non fermented black soybean milk processing on bioactive compounds and antioxidant capacity.** Rio de Janeiro, 2017. Thesis (Doctor of Science, D.Sc.). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Black soybeans are millennia culture in the East, that in the last two decades has attracted the attention of Western researchers and consumers. In addition to good nutritional quality, black soybeans contain bioactive compounds, especially isoflavones and anthocyanins, which are related to anti-diabetes, anti-obesity, anti-cancer, anti-inflammatory, hypolipidemic and antimutagenic activity. Unlike isoflavones, anthocyanins are present exclusively in black-colored soybeans as they are the pigments responsible for the seed coating color. These pigments are unstable compounds that can be degradated by heat, light and pH conditions. The use of black soybean as raw material for the production of soy beverages seems to be an alternative in the supply of soy-based foods with potential health benefits. The present work aimed at evaluating the influence of black soybean milk and fermented black soybean milk processing, developing potential health promoters' products by processes that result in greater preservation of these compounds, especially anthocyanins. This experimental study was carried out in three steps: preliminary studies to evaluate the traditional or alternatively processes, referenced in the literature, to obtain soybean extract; study of thermal processing steps during black soybean milk obtaining process in order to reduce bioactive compounds loss; and the study of the effects of black soybean milk fermentation with *Lactobacillus acidophilus* (LA-5®) on its bioactive compounds, antioxidant activity and viability of probiotics during 28 days of storage at 8 ± 2 ° C. The results showed that the traditional processes of obtaining soybean milk used for yellow soybeans are not suitable for black soybeans.

The water disposed during processing and the time and temperature applied conditions (cooking and conservation treatment) are detrimental to antocyanins maintenance.

The most suitable processing conditions to obtain the black soybean milk were: a) grounded seeds; b) cooking black soybean milk at 80 ° C for 5 min; c) cooking water and pasteurization at 98 °C for 5 min. The sensory acceptance of chocolate flavor formulation was similar to that of an organic commercial beverage. The black soybean milk fermented with probiotic culture showed a reduction of about 20% in the anthocyanin content. However, it had an increase in the isoflavone aglycone content and the estimated antioxidant activity was superior when compared to non fermented black soybean milk. The beverages formulated from fermented black soybean milk with sugar or different fruit preparations showed good sensory acceptance, with emphasis on the strawberry flavor that received 7,6, on average, corresponding to a "like very much" evaluation by consumers, in a hedonic scale of nine points. The results obtained in this work suggest that black soybean beverages are potential products to increase black soybeans consumption in the Western market.

Keywords: Black soybean, black soymilk, fermented black soymilk, anthocyanins, isoflavones, antioxidante activity, probiotics, sensorial acceptance.

SUMÁRIO

Capitulo 1 Introdução, justificativa, objetivos e estrutura da tese...20

1.1 Introdução.....20

1.2 Justificativa para o desenvolvimento do trabalho.....21

1.3 Objetivos.....22

1.3.1 Objetivo geral.....22

1.3.2 Objetivos específicos.....22

1.4 Estrutura do trabalho.....23

1.5 Publicações e resumos resultantes desta pesquisa de tese.....24

Capitulo 2 Revisão bibliográfica.....26

2.1 Caracterização química dos grãos de soja preta.....26

2.1.1 Antocianinas.....29

2.1.2 Isoflavonas.....31

2.2 Soja preta e saúde.....34

2.3 Processamento de soja preta.....35

2.3.1 Extrato de soja e extrato de soja preta.....36

2.4 Bebidas fermentadas de soja e de soja preta.....39

2.5 Referências bibliográficas.....42

Capitulo 3 Testes preliminares para obtenção de extrato de soja preta utilizando metodologias descritas ou adaptadas da literatura 52

3.1 Introdução.....52

3.2 Materiais e métodos.....53

3.2.1 Matérias-primas.....53

3.2.2 Métodos.....54

3.2.2.1 Fase I.....54

3.2.2.2 Fase II.....57

3.3 Resultados.....60

3.3.1 Fase I.....60

3.3.2 Fase II.....62

3.4 Conclusões.....64

3.5 Referências.....65

Capitulo 4 Estudo dos parâmetros tempo e temperatura de cozimento e dos tratamentos de conservação na obtenção de extrato de soja preta com maiores teores de compostos bioativos e atividade antioxidante.....69

4.1 Introdução.....69

4.2 Material e métodos..... 70

4.2.1 Materia-prima..... 70

4.2.2 Métodos..... 70

4.3 Resultados..... 80

4.3.1 Caracterização do grão de soja preta..... 80

4.3.2 Obtenção de extrato de soja preta (planejamento experimental).....93

4.3.3 Avaliação de diferentes tratamentos de conservação..... 104

4.3.4 Teste de aceitação de bebida de soja preta formulada sabor chocolate.. 107

4.4 Conclusões..... 110

4.5 Referências..... 111

Capitulo 5 Obtenção de extrato fermentado de soja preta com probióticos e avaliação do processo de fermentação sobre composição centesimal, compostos bioativos, atividade antioxidante e viabilidade da cultura utilizada até 28 dias de armazenamento.....119

5.1 Introdução..... 119

5.2 Material e métodos..... 120

5.2.1 Matérias-primas..... 120

5.2.2 Métodos..... 120

5.2.2.1 Obtenção do extrato hidrossolúvel de soja preta..... 120

5.2.2.2 Obtenção do extrato fermentado de soja preta com probióticos..... 121

5.2.2.3 Caracterização dos grãos de soja, do extrato de soja preta e da okara..... 121

5.2.2.4 Avaliação do efeito do processo de fermentação e caracterização do produto fermentado durante o período de armazenamento..... 121

5.2.2.5 Avaliação da inativação de fatores antinutricionais.....124

5.2.2.6 Aceitação sensorial de bebidas fermentadas de soja preta..... 124

5.3 Resultados..... 126

5.3.1 Caracterização dos grãos, extrato e okara de soja preta..... 126

5.3.2 Avaliação do efeito do processo de fermentação e caracterização do produto fermentado durante período de armazenamento.....134

5.3.3 Avaliação da inativação de fatores antinutricionais..... 148

5.3.4 Aceitação sensorial de bebidas fermentadas de soja preta.....149

5.4 Conclusões.....152

5.5 Referências bibliográficas.....153

Capitulo 6 Conclusões finais e sugestões para trabalhos futuros...160

6.1 Conclusões finais.....160

6.2 Sugestões para trabalhos futuros.....161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de 6 antocianinas detectadas em 60 variedades de soja preta chinesas: (1) definidina-3-glicosídeo, R_1=R_2=OH, R_3=glicose; (2) cianidina-3-galactosídeo, R_1=OH, R_2=H, R_3= galactose; (3) cianidina-3-glicosídeo, R_1=OH, R_2=H, R_3= glicose; (4) petunidina-3-glicosídeo, R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=glicose; (5) peonidina-3-glicosídeo, R_1=OCH_3, R_2=H, R_3=glicose; (6) malvidina-3-glicosídeo, R_1=R_2= OCH_3, R_3=glicose. 30

Figura 2 Estrutura das isoflavonas agliconas da soja..... 32

Figura 3 Estrutura das isoflavonas da soja. 332

Figura 4. Soja com tegumento preto e cotilédone amarelo. 54

Figura 5. Processos para obtenção de extrato de soja preta testados na Fase I. (A) Processo1; (B) Processo 2; (C) Processo 3. A*: antes da pasteurização. D*: depois da pasteurização 55

Figura 6. Processos para obtenção de extrato de soja preta testados na Fase II. (A) Processo 4; (B) Processo 5. A*: antes da pasteurização. D*: depois da pasteurização 58

Figura 7. Soja preta em grãos (A) e soja moída (B). 59

Figura 8. (A) água de maceração; (B) água de cozimento. 611

Figura 9. Extrato de soja preta com menor perda de antocianinas..... 64

Figura 10. Diagrama de processamento para obtenção de extrato de soja preta..... 72

Figura 11. Soluções metanólicas de antocianinas de grãos de soja preta (A) e extrato de soja preta (B). 74

Figura 12. Preparação de placa para análise de atividade antioxidante pelo método ORAC. 77

Figura 13. Ficha de avaliação para teste de aceitação de bebida de soja preta formulada sabor chocolate e duas bebidas de soja amarela sabor chocolate comerciais. 79

Figura 14. Solução metanólica de antocianinas de soja preta..... 81

Figura 15. Cromatograma obtido por FPLC-PDA, processado a 520 nm, de extrato metanólico de antocianinas de grãos de soja preta (Pico 1: delfinidina-3-glicosídeo; Pico 2: cianidina-3-glicosídeo; Pico 3: petunidina-3-glicosídeo). 82

Figura 16. Espectros de massas e estruturas químicas das antocianinas encontradas nos grãos da soja preta avaliada: (A): Delfinidina-3-glicosídio; (B) Cianidina-3-glicosídeo; (C) Petunidina-3-glicosídeo. 83

Figura 17. Cromatograma obtido por HPLC-PDA, processado a 260 nm, do extrato de isoflavonas do grão de soja preta (Pico 1: glicitina; Pico 2: daidzina; Pico 3: genistina e Pico 4: daidzeína). 86

Figura 18. Curva da % de DPPH• remanescente em função da concentração de antioxidante. 89

Figura 19. Atividade antioxidante da casca de quatro linhagens de soja preta desenvolvidas pela Embrapa determinada pelo método DPPH em trabalho realizado por Pereira (2015). 90

Figura 20. Estruturas químicas de a: cianidina, b: quercetina, c: trolox. URL 91

Figura 21. Conteúdo de antocianinas (médias) para os sete tratamentos do extrato de soja preta (E1= 80°C/5 min; E2= 80°C/15 min; E3= 98°C/5 min; E4= 98°C/15 min; E5= 89°C/10 min; E6= 89°C/10 min; E7= 89°C/10 min). 94

Figura 22. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial 2^2 sobre o teor de antocianinas no extrato de soja preta. 95

Figura 23. Antocianinas como uma função do tempo (min) e da temperatura (°C) de cozimento. 96

Figura 24. Conteúdo de isoflavonas totais (médias), equivalente em agliconas, para os sete tratamentos do extrato de soja preta (E1= 80°C/5 min; E2= 80°C/15 min; E3= 98°C/5 min; E4= 98°C/15 min; E5= 89°C/10 min; E6= 89°C/10 min; E7= 89°C/10 min). 98

Figura 25. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial 2^2 sobre o teor de isoflavonas no extrato de soja preta. 99

Figura 26. Isoflavonas como uma função do tempo (min) e da temperatura (°C) de cozimento. 99

Figura 27. Superfície de resposta da atividade antioxidante (DPPH) para extrato de soja preta em função do tempo (min) e temperature (°C) de cozimento. 101

Figura 28. Superfície de resposta da atividade antioxidante (ORAC) para extrato de soja preta em função do tempo (min) e temperatura (°C) de cozimento. 103

Figura 29. Distribuição percentual das notas dos participantes para bebidas de soja sabor chocolate (1 = bebida de soja comercial líder ; 2 = bebida experimental de soja preta; 3 = bebida de soja comercial orgânica), avaliadas usando escala hedônica de 9 pontos. 108

Figura 30. Amostras de bebidas fermentadas de soja preta formuladas com açúcar (530), preparado de fruta sabor morango (732), preparado de fruta sabor ameixa preta (397) e preparado de fruta sabor uva (852). 125

Figura 31. Antocianinas no grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta. 129

Figura 32. Isoflavonas no grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta (base seca). 130

Figura 33. Consumo de açúcares durante a fermentação e período de armazenamento de 28 dias. 138

Figura 34. Antocianinas presentes no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento. 142

Figura 35. Isoflavonas presentes no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento. 144

Figura 36. Atividade antioxidante pelo método DPPH do EHSP antes e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento. 146

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Perfil e teor de antocianinas presentes na $SP_{comercial}$ e dos extratos de soja preta obtidos a partir dos processos avaliados na Fase I 61

Tabela 2. Perfil e teor de antocianinas presentes na $SP_{Embrapa}$ e dos extratos de soja preta obtidos a partir dos processos avaliados na Fase II 63

Tabela 3. Fatores (temperatura e tempo de cozimento) para planejamento fatorial 2^2 do processamento de extrato de soja preta 71

Tabela 4. Isoflavonas e fator de conversão aglicona/glicosídeo correspondente 75

Tabela 5. Composição centesimal da soja BRM 09-50995: grão integral, cotilédone e casca 80

Tabela 6. Teores de isoflavonas no grão de soja preta da cultivas BRM 09-50995 87

Tabela 7. Médias de compostos bioativos e capacidade antioxidante de extrato de soja preta submetido a quatro tratamentos de conservação diferentes 105

Tabela 8. Valores médios de aceitação de bebida de soja preta experimental achocolatada e duas bebidas de soja achocolatadas comerciais para cada um dos três subgrupos de preferências (*clusters*) 109

Tabela 9. Composição centesimal do grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta 127

Tabela 10. Rendimento, umidade e teor de isoflavonas do grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta 132

Tabela 11. Atividade antioxidante pelo método ORAC do grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta 132

Tabela 12. Atividade antioxidante pelo método DPPH do grão (SP) e extrato (EHSP) de soja preta 133

Tabela 13. Composição centesimal do EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) 134

Tabela 14. Teores de açúcares no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento 137

Tabela 15. Características de acidez e concentração da cultura probiótica pela fermentação do EHSP durante 28 dias de armazenamento 139

Tabela 16. Antocianinas presentes no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento 141

Tabela 17. Isoflavonas presentes no EHSP e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento 144

Tabela 18. Atividade antioxidante pelo método DPPH do EHSP e do EHSP ferm durante 28 dias de armazenamento..... 146

Tabela 19. Atividade antioxidante pelo método ORAC do EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento 147

Tabela 20. Atividade ureática do EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento 148

Tabela 21. Valores médios de aceitação[§] de bebidas fermentadas de soja preta com diferentes formulações..... 149

Tabela 22. Valores médios de aceitação[§] de bebidas fermentadas de soja preta para cada um dos três subgrupos de preferências (*clusters*) 150

Tabela 23. Valores médios de aceitação[§] de bebidas fermentadas de soja preta em função da frequência de consumo de bebidas de soja pelos provadores..... 151

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Composição centesimal (%) de diferentes sojas pretas (base seca).....27

Quadro 2. Antocianinas encontradas na casca de soja preta.....30

Quadro 3. Conteúdo de isoflavonas em diferentes cultivares de soja preta.....34

Quadro 4. Conteúdo de proteínas de bebidas à base de soja disponíveis no mercado brasileiro.....37

CAPITULO 1 INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

1.1 INTRODUÇÃO

A soja preta é uma variedade de soja não comum ao ocidente, que tem despertado a atenção de pesquisadores e consumidores pelo seu potencial promotor de saúde. Conhecida há centenas de anos na China, Índia, Coréia e Japão, onde é utilizada como alimento saudável e extrato herbal, seu cultivo no Brasil ainda é incipiente. Estudos de melhoramento tradicional estão sendo desenvolvidos com diferentes linhagens de soja preta pelo programa de melhoramento de soja para alimentação humana da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Para obtenção de uma cultivar comercial, além das características agronômicas, as linhagens devem ter características físico-químicas e sensoriais adequadas, bem como apresentar potencial de utilização em processamento de diferentes produtos.

A divulgação das propriedades benéficas da soja preta na mídia tem despertado a atenção do consumidor, assim como das indústrias alimentícias, sendo os produtos à base de soja preta um nicho a ser explorado e uma oportunidade de desenvolvimento de tecnologias e produtos de alto valor agregado. Atualmente é possível encontrar no mercado brasileiro apenas o grão e a farinha de soja preta, porém não estão disponíveis bebidas de soja preta ainda que as bebidas de soja tenham conquistado uma posição de destaque no mercado brasileiro de sucos e bebidas vegetais.

Não obstante as informações sobre a soja preta e seus potenciais benefícios à saúde, poucos são os estudos do efeito do processamento sobre seus compostos bioativos e sua atividade antioxidante. Dentre os principais compostos bioativos contidos na soja preta, estão as isoflavonas e as antocianinas, essas últimas presentes apenas em cultivares de soja com a casca preta.

A avaliação dos efeitos do processamento do extrato de soja preta sobre a perda ou alteração de seus compostos bioativos, assim como o aperfeiçoamento desses processos produtivos, são aspectos-chave na formulação de produtos comerciais à base de soja preta como potenciais promotores de saúde.

Considerando ainda a importância das bebidas para o mercado ocidental de produtos de soja, a fermentação do extrato com culturas probióticas é uma opção de processamento que pode resultar na obtenção de um produto com boas carcaterísticas sensoriais e aumento da disponibilidade de nutrientes, unindo os benefícios da soja ao de microrganismos probióticos. Assim como a soja, os probióticos também configuram como alimentos com alegação de propriedade funcional uma vez que quando administrados em doses apropriadas conferem benefício á saúde do hospedeiro.

Para o mercado de bebidas funcionais, foi estabelecida uma tendência para 2020 dos 20 ingredientes mais importantes para a indústria de alimentos, nos quais estão incluídos as isoflavonas de soja e os probióticos. Além disso, polifenóis (a exemplo das antocianinas, além das próprias isoflavonas) são citados como antioxidantes naturais. Portanto, a avaliação das perdas ou potencialização dos compostos bioativos durante o processamento, bem como da atividade antioxidante a eles relacionada, é de fundamental importância para que alimentos de soja preta sejam produzidos e comercializados tendo seus compostos bioativos preservados.

1.2 JUSTIFICATIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Haja vista a carência de informações científicas do impacto do processamento sobre os compostos fitoquímicos, a atividade antioxidante e a qualidade nutricional da soja preta, bem como seus potenciais benefícios à saúde humana, é importante que novos produtos sejam desenvolvidos considerando maximizar a preservação de seus compostos bioativos em quantidade e qualidade necessárias para possibilitar a promoção desses benefícios. O desenvolvimento de um produto a partir de soja preta, que contenha microrganismos probióticos, que agregue os benefícios da soja

somados aos das antocianinas, será mais uma alternativa ao consumidor que deseja alimentos saudáveis, práticos e de sabor agradável.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do processamento da bebida de soja preta e bebida de soja preta fermentada sobre seus compostos bioativos, atividade antioxidante, características físico-químicas, nutricionais e sensoriais, desenvolvendo produtos com potencial promotor de saúde por meio de processos que resultem em maior preservação desses compostos, especialmente de antocianinas.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição química e de compostos bioativos (isoflavonas e antocianinas) do grão de soja preta, bem como estimar sua atividade antioxidante;
- Obter extrato de soja preta e avaliar a influência dos diferentes processamentos sobre os compostos bioativos e atividade antioxidante;
- Obter e avaliar a influência do processo de fermentação do extrato de soja preta com probiótico sobre composição centesimal, compostos bioativos, atividade antioxidante e viabilidade da cultura utilizada durante 28 dias de armazenamento;
- Avaliar a aceitação sensorial de bebida achocolatada formulada a partir do extrato de soja preta pelo consumidor;
- Avaliar a aceitação sensorial de bebidas formuladas a partir do extrato de soja preta fermentado pelo consumidor, com e sem adição de polpas de frutas;
- Identificar processamentos adequados para obtenção de bebidas de soja preta visando à redução na perda de compostos bioativos e boa aceitação sensorial.

1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO

A organização deste trabalho foi dividida em capítulos conforme descrito a seguir:

No Capitulo 1, encontram-se descritos a introdução, justificativa, objetivos e estrutura da tese.

No Capítulo 2, é apresentada uma revisão bibliográfica abordando a importância da soja preta, sua composição, potenciais benefícios à saúde, processos de obtenção de bebidas de soja e bebidas fermentadas de soja, assim como o efeito de diferentes processos sobre as caracteríscicas dos produtos finais.

No Capítulo 3, são descritos os testes preliminares para obtenção de extrato de soja preta, que permitiram avaliar condições favoráveis ou não ao seu processamento.

No Capítulo 4, é apresentado o planejamento experimental fatorial realizado para avaliar a influência das variáveis tempo e temperatura de cozimento sobre compostos bioativos e atividade antioxidante do extrato de soja preta, bem como é demonstrada a influência de diferentes tratamentos de conservação sobre esses mesmos parâmetros. A aceitação sensorial do extrato de soja preta obtido pelo processo com menor perda de compostos bioativos, formulado com achocolatado, comparada à de duas outras bebidas comerciais de soja sabor chocolate também é apresentada neste capítulo.

No Capítulo 5, são descritos o desenvolvimento de bebida de soja preta fermentada com cultura probiótica e a influência da fermentação sobre a composição centesimal, de compostos bioativos e atividade antioxidante do produto final. Complementarmente, são apresentados os resultados dos estudos realizados durante o armazenamento da bebida fermentada por 28 dias. Também é apresentada a aceitação sensorial do consumidor frente à bebida fermentada recém-processada de soja preta adicionada ou não de preparados de frutas.

1.5 PUBLICAÇÕES E RESUMOS RESULTANTES DESTA PESQUISA DE TESE

Artigos completos publicados em periódicos

ESTEVES, T. C. F.; FELBERG, I.; CALADO, V. M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Effect of black soymilk processing conditions on anthocyanins content. Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT), v. 11, p. 56-60, 2017.

Publicações em Anais de Congressos (Trabalho completo)

ESTEVES, T. C. F.; FARIA-MACHADO, A.; FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; CARRÃO-PANIZZI, M. C; CALADO, V. M. A.; PEREIRA, J. Atividade antirradical livre de compostos bioativos de soja preta (*Glycine max* L. Merril) In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. Florianópolis – SC, Brasil, 2014.

ESTEVES, T. C. F.; FELBERG, I.; FARIA-MACHADO, A.; GODOY, R.; SANTIAGO, M.; PACHECO, S.; CALADO, V.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. A proposal of process conditions for obtaining black soymilk. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN HUMAN NUTRITION, FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY 2016. Toronto, Canadá, 2016.

Publicações em Anais de Congressos (Resumo e resumo expandido)

ESTEVES, T. C. F.; FELBERG, I.; PEREIRA, J. N.; SANTIAGO, M. C. P. A.; GODOY, R. L. O.; GOUVÊA, A. C. M. S.; CARRÃO-PANIZZI, M. C; CALADO, V. M. A. Obtenção de extratos hidrossolúveis de soja preta (*Glycine max* L. Merril) e avaliação da perda de antocianinas no processamento. In: AMERICAS: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE UTILIZAÇÃO DE SOJA. Bento Gonçalves – RS, Brasil, 2013.

PEREIRA, J. N.; GODOY, R. L. O.; FELBERG, I.; ESTEVES, T. C. F.; SANTIAGO, M. C. P. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Avaliação de metodologias de extração e caracterização do perfil de antocianinas em soja preta por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (MS). In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (XXIV CBCTA). Aracajú - SE, Brasil, 2014.

ESTEVES, T. C. F.; PEREIRA, J. N.; FELBERG, I.; GODOY, R. L. O.; SANTIAGO, M. C. P. A.; FARIA-MACHADO, A.; ANTONIASSI, R.; CALADO, V. M. A; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Caracterização de linhagem de soja preta quanto a sua composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA. Florianópolis – SC, Brasil, 2015.

ESTEVES, T. C. F.; FELBERG, I.; CALADO, V. M. A; GODOY, R. L. O.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PEREIRA, J. N.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Influência

da moagem do grão de soja preta na obtenção de extrato hidrossolúvel rico em antocianinas. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA. Florianópolis – SC, Brasil, 2015.

WILHELM, A. E.; PEREIRA, J. N.; SILVA, R.P.D.; LIMA, N. A.; ESTEVES, T. C. F.; ANTONIASSI, R.; FELBERG, I.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Caracterização de linhagem de soja preta quanto aos ácidos graxos. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA. Florianópolis – SC, Brasil, 2015.

CAPITULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A soja (*Glycine max* (L.) Merril) é uma espécie pertencente à família Leguminosae (Fabaceae). Existem diferentes formas, tamanhos e cores de grãos de soja, embora sejam mais conhecidos pelo formato quase esférico e coloração amarela. No entanto, dependendo dos pigmentos presentes, o tegumento externo dos grãos (casca) pode ser amarelo, verde, marrom, preto ou uma combinação dessas cores (WILLIAMS, 1950; GANESAN E XU, 2017).

A origem da soja preta remonta da Asia e acredita-se que seus grãos foram cultivados pela primeira vez no nordeste da China durante a dinastia Shang (1700-1100 aC) (ASTAD e PAICE, 2011). Extratos herbais de soja preta têm sido utilizados tradicionalmente na medicina chinesa por centenas de anos como desintoxicante, anti-inflamatório, no tratamento da diabetes, hipertensão, problemas de circulação sanguínea, dentre outros (KIM *et al*., 2007; XU e CHANG, 2008).

Embora o cultivo e a utilização da soja preta na Ásia ainda sejam menos populares do que da soja amarela, as indústrias desenvolveram a produção em larga escala de alimentos tradicionais como *tofu*, *tempeh*, extrato de soja, molho de soja, *natto* e *miso*, utilizando a soja preta como matéria-prima (ASTAD e PAICE, 2011). No ocidente, a oferta de produtos industrializados de soja preta é incipiente, sendo possível encontrar no Brasil apenas grãos ou farinha de soja preta em lojas de alimentos especializados.

2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS DE SOJA PRETA

A composição química da soja, independente da cor da casca, pode variar em função da cultivar, época de crescimento, localização geográfica e condições ambientais (LIU, 1999; HA *et al*., 2009). Da mesma forma que a soja amarela, os grãos de soja preta são compostos principalmente de cotilédone, tegumento ou casca, e hipocótilo, que representam, em média, 90%, 8% e 2%, respectivamente, do peso total da semente (LIU, 1999; XU e CHANG, 2008). O cotilédone contém as principais substâncias de reserva como proteínas, lipídeos e carboidratos, além de conter a maior parte das isoflavonas presentes

no grão (TSUKAMOTO *et al*., 2001). Já a casca, que atua como uma barreira protetora para o cotilédone tem como grande diferencial, no caso da soja preta, a presença das antocianinas (XU e CHANG, 2008).

A soja preta apresenta composição centesimal semelhante à soja amarela com conteúdo médio de 40% de proteínas, 20% e lipídios, 35% de carboidratos e 5% de cinzas (LIU, 1999), sendo as diferenças observadas em função das características genéticas e condições ambientais conforme exemplos listados no Quadro 1.

Quadro 1. Composição centesimal (%) de diferentes sojas pretas (base seca)

Soja preta	Proteína	Lipidios	Cinzas	Referência
Tainan 5	45,70	21,76	4,72	Shih, Yang, Kuo, 2002
Heugcheong	41,8	ND*	ND*	Ha *et al*., 2009
Geomjeong 2	39,0			
Cheongja 2	44,1			
Cheongja 3	41,9			
NT 7001	40,72	25,43	4,51	Rezende, 2012
NT 7002	39,85	23,37	5,40	
BRM09-50901	41,18	19,46	5,13	Pereira, 2015
BRM09-50995	41,15	19,79	5,24	
BRM09-50682	41,51	19,44	5,44	
BRM11-51400	41,69	19,12	5,81	

* ND – valor não determinado na referência

Entre os carboidratos solúveis da soja, destacam-se os oligossacarídeos rafinose e estaquiose. Oliveira *et al*. (2010) avaliaram 28 genótipos/cultivares de soja de diferentes colorações de casca e verificaram uma faixa de 0,39 a 0,97 g/100g para rafinose e de 2,35 a 4,41 g/100g para estaquiose. As diferenças encontradas foram independentes da cor da casca. Pereira (2015) avaliou 4 linhagens de soja preta e encontrou variação de 1,41 a 1,56 g/100g de rafinose e 4,67 a 5,24 g/100g de estaquiose. Lee *et al*. (2013) verificaram teor de 0,97 g/100g de rafinose e 1,91 g/100g de estaquiose em uma cultivar de soja preta desenvolvida na Coreia.

Os oligossacarídeos da soja são frequentemente associados à ocorrência de flatulência e desconforto abdominal em humanos, pois não são degradados pelas enzimas digestivas humanas. Dessa forma, os açúcares chegam intactos no intestino delgado e são metabolizados por microrganismos, resultando na produção de gases como dióxido de carbono, hidrogênio, nitrogênio e metano, dependendo da dieta e da microbiota individual (LIU, 2004). Por outro lado, esses oligossacarídeos também são prebióticos, ou seja, componentes alimentares não digeríveis que afetam positivamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou mais bactérias benéficas residentes no cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995; PIMENTEL, FRANCKI e GOLLÜCKE, 2005)

Já os carboidratos insolúveis da soja incluem celulose, hemicelulose, pectina e traços de amido. A casca da semente representa 8% do seu peso em base seca, mas contém cerca de 86% dos carboidratos não digeríveis, contribuindo, portanto, com uma grande quantidadede de carboidratos insolúveis para o grão de soja (LIU, 2004).

Além da sua composição em macronutrientes, a soja preta possui compostos potencialmente bioativos como as isoflavonas, os esteróis, o ácido fítico, os inibidores de proteases, as saponinas e compostos fenólicos, que são potencialmente efetivos para a saúde humana e na redução do risco de várias doenças crônicas (GANESAN e XU, 2017). Alguns desses compostos, como inibidores de proteases e lectinas, são considerados fatores antinutricionais, pois podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de nutrientes (SILVA e SILVA, 2000), contudo, são instáveis ao calor e facilmente destruídos pelo tratamento térmico (LIU, 2004). Além disso, sabe-se hoje que alguns destes fatores antinutricionais, quando em quantidades adequadas, podem apresentar efeitos positivos no organismo. Neste novo contexto, Kang *et al*. (2010) e Rossi *et al*. (2011) sugerem que a inativação desses fatores em produtos de soja seja completa.

Em relação a compostos bioativos e propriedades antioxidantes, pesquisas mostraram que a soja preta possui maior atividade antioxidante

quando comparada à soja amarela (JENG *et al*., 2010; LEE *et al*., 2015; SANJUKTA e RAI, 2016). Esse potencial antioxidante característico é devido à presença de polifenóis, que são metabólitos secundários de plantas com propriedades antioxidantes que podem ajudar a proteger o organismo dos danos provocados por radicais livres (GANESAN e XU, 2017). Dentre os principais polifenóis contidos na soja preta, estão as isoflavonas e as antocianinas, essas últimas presentes apenas em variedades de soja com tegumento preto (HA *et al*, 2009).

2.1.1 Antocianinas

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides e estão amplamente distribuídas no mundo vegetal. São responsáveis por uma grande variedade de cores das plantas, incluindo azul, roxo, violeta, magenta, vermelho e laranja (DAMODARAN, KIRK e FENNEMA, 2008) e constituem os principais pigmentos da soja preta, sendo encontrados no tegumento das sementes (KOH, YOUN e KIM, 2011). Além de seus efeitos de coloração nas frutas, as antocianinas são consideradas compostos funcionais em função de sua capacidade antioxidante. Esses pigmentos podem apresentar capacidade de prevenir a oxidação lipídica da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipossomos, bem como de exercer função de desativação de vários radicais livres (KÄHKÖNEN e HEINONEN, 2003).

Um total de 9 diferentes antocianinas foram identificadas em casca de soja preta descritas em vários estudos. O perfil de antocianinas de alguns desses trabalhos estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Antocianinas encontradas na casca de soja preta

Antocianinas	Referência
Delfinidina-3-glicosídeo Cianidina-3-glicosídeo Petunidina-3-glicosídeo	Choung *et al*., 2001; Lee *et al*., 2009; Zhang *et al*. 2011; Pereira, 2015
Pelargonidina-3-glicosídeo Cianidina Catequina-cianidina-3-glicosídeo Delfinidina-3-galactosídeo	Lee *et al*., 2009
Cianidina-3-galactosídeo Peonidina-3- glicosídeo	Lee *et al*., 2009; Zhang *et al*. 2011; Rezende, 2012
Malvidina-3- glicosídeo	Zhang *et al*. 2011

Em contrapartida, foi verificada uma variação muito grande entre os resultados publicados em relação a teores. Um exemplo foi a avaliação do conteúdo total de antocianinas em 60 variedades de soja preta originárias de diferentes regiões da China que apresentou variação de 98,8 a 2132,5 mg de antocianinas por 100 g de casca de soja preta. Cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo foram encontradas em todas as variedades, sendo a cianidina-3-glicosídeo a antocianina majoritária em todas as sojas pretas estudadas (Figura 1) (ZHANG *et al*., 2011).

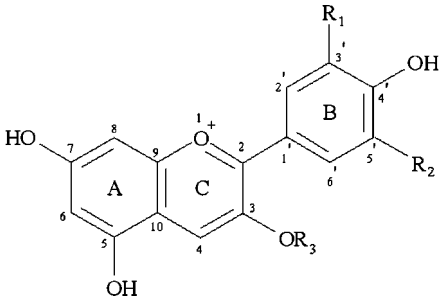


Figura 1. Estrutura química de 6 antocianinas detectadas em 60 variedades de soja preta chinesas: (1) definidina-3-glicosídeo, R_1=R_2=OH, R_3=glicose; (2) cianidina-3-galactosídeo, R_1=OH, R_2=H, R_3= galactose; (3) cianidina-3-glicosídeo, R_1=OH, R_2=H, R_3= glicose; (4) petunidina-3-glicosídeo, R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=glicose; (5) peonidina-3-glicosídeo, R_1=OCH_3, R_2=H, R_3=glicose; (6) malvidina-3-glicosídeo, R_1=R_2= OCH_3, R_3=glicose.

As antocianinas são compostos instáveis, suscetíveis à incidência de calor, luz e condições de pH, que podem sofrer degradação induzindo transformações químicas e afetando o desempenho e atividade biológica de alimentos que as contém. Muitos alimentos necessitam ser termicamente processados antes de consumidos e esse processo pode afetar fortemente o conteúdo de antocianinas no produto final (WANG *et al*., 2014). Essa influência do calor sobre a degradação das antocianinas foi verificada por Xu e Chang (2008), que encontraram um decréscimo de 93% nas antocianinas monoméricas de grãos de soja preta submetidos ao processo de cozimento em temperatura de ebulição por 120 minutos. Wang *et al*. (2014) também observaram a ação da temperatura sobre as antocianinas extraídas da casca da soja constatando que após aquecimento a 200 °C, o conteúdo de cianidina-3-glicosídeo decresceu a 13%.

2.1.2 Isoflavonas

As isoflavonas predominantes na soja são genistina e daidzina (como glicosídeos) e suas formas agliconas correspondentes, genisteína e daidzeína (ANDRADE *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2016). Suas atividades biológicas parecem estar relacionadas com suas formas (BARBOSA *et al*, 2006) e a presença e concentração nos produtos à base de soja dependem das condições de processamento (WANG e MURPHY,1996; GÓES-FAVONI *et al.*, 2004).

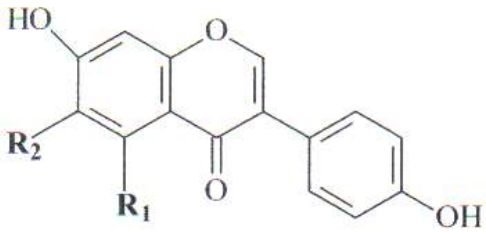
Esses compostos estão presentes na soja como glicosídeos (97-98%) e agliconas (2-3%) e são as agliconas que possuem atividade biológica. As isoflavonas glicosídicas podem ser convertidas em agliconas pela ação de glicosidases, formando compostos biologicamente ativos (QIU e CHANG, 2010).

Assim como a composição centesimal dos grãos, a concentração e distribuição das isoflavonas podem variar de acordo com as condições ambientais e de plantio (safra, solo, umidade, região geográfica, temperatura,

luminosidade) e fatores genéticos (cultivar, tamanho da semente, tipo de tecido) (CHO *et al*., 2013).

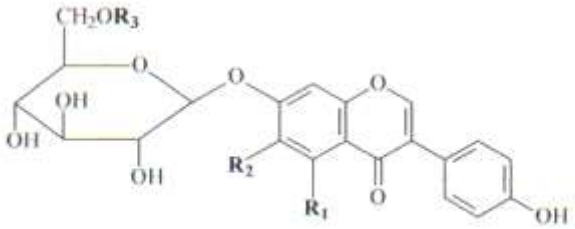
Ainda que não sejam exclusivas da soja preta, as isoflavonas são compostos cuja atividade biológica é muito estudada por possuírem estrutura química e similaridades funcionais ao estrogênio humano 17-β-estradiol (GENOVESE e LAJOLO, 2002; MUNROE *et al*., 2003), sendo classificadas como moduladores seletivos naturais dos receptores de estrogênio apresentando efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos, em função do hormônio endógeno, quantidade e tipo dos receptores estrogênicos (YUAN e CHANG, 2007). As isoflavonas estão associadas à redução do risco de hipertensão e doenças cardiovasculares, bem como de desordens relacionadas a perturbações hormonais como síndrome pós-menopausa, osteoporose, câncer de mama e de colón (HONG *et al*., 2012).

As isoflavonas da soja e derivados são de três tipos e cada tipo apresenta quatro formas químicas (Figura 2 e Figura 3), somando, assim, 12 diferentes estruturas químicas: as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), os β-glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), e os derivados glicosilados acetilados (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina), e glicosilados malonilados (6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina) (JACKSON *et al*., 2002).



Aglicona	R_1	R_2
Daidzeína	H	H
Genisteína	OH	H
Gliciteína	H	OCH_3

Figura 2 Estrutura das isoflavonas agliconas da soja.
Fonte: Adaptado de Felberg (2010).



Glicosídeo	R_1	R_2	R_3
Daidzina	H	H	H
Genistina	OH	H	H
Glycitina	H	OCH_3	H
6"-O-Acetildaidzina	H	H	$COCH_3$
6"-O-Acetilgenistina	OH	H	$COCH_3$
6"-O-Acetilglicitina	H	OCH_3	$COCH_3$
6"-O-Malonildaidzina	H	H	$COCH_2COOH$
6"-O-Malonilgenistina	OH	H	$COCH_2COOH$
6"-O-Malonilglicitina	H	OCH_3	$COCH_2COOH$

Figura 3 Estrutura das isoflavonas da soja.
Fonte: Adaptado de Felberg (2010).

Em estudo realizado por Kumar *et al*. (2010), foram analisados 6 genótipos de soja amarela e 6 de soja preta e não foram observadas diferenças significativas para as formas individuais e para o conteúdo de isoflavonas totais em soja amarela (104,54 mg/100g) e soja preta (108,43mg/100g). Na literatura, a variação de isoflavonas em soja preta é grande conforme pode ser observado no Quadro 3.

Quadro 3. Conteúdo de isoflavonas em diferentes cultivares de soja preta

Número de cultivares estudadas	Médias de isoflavonas (mg/100g)	Referências
28	100,91	Kim *et al*., 2005
1	100,72	Xu e Chang, 2008
6	46,49 a 147,88	Kumar *et al*., 2010
4	237,39	Cho *et al*., 2013
4	59,82 – 140,75	Pereira, 2015

2.2 SOJA PRETA E SAÚDE

Recentemente, estudos sobre as atividades biológicas da soja preta têm crescido significativamente, devido à presença dos compostos fenólicos, isoflavonas e, em especial, pelo conteúdo de antocianinas. Esses últimos são compostos bioativos presentes no tegumento dos grãos de soja preta e a redução do risco de várias doenças é atribuída, em parte, à sua atividade antioxidante (ASTAD e PAICE, 2011).

Pesquisas têm demonstrado que a soja preta, pelos seus compostos bioativos, possui atividade antidiabetes (KANAMOTO *et al.*, 2011), antiobesidade (KIM *et al.*, 2007; DO *et al.*, 2011), anticâncer (KIM *et al.*, 2008; SLAVIN, KENWORTHY e LIANGLI, 2009; YE e NG, 2011; ZOU e CHANG, 2011), anti-inflamatória (KIM *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2011), hipolipidêmica (TAKAHASHI *et al.*, 2005; SLAVIN, KENWORTHY e LIANGLI, 2009) e antimutagênica (HUNG, HUANG e CHOU, 2007), entre outras. Nesse sentido, o consumidor vem mostrando crescente interesse por produtos prontos que agreguem praticidade e benefícios à saúde (ITAL, 2010).

A ingestão diária de no mínimo 25 g de proteína de soja é associada à redução do risco de doenças cardiovasculares, inclusive com permissão de uso de alegações de saúde tanto no Brasil quanto em outros países (TAKAHASHI *et al.*, 2005; BRASIL, 2008; USFDA, 1999).

Em investigação do efeito inibidor da soja preta sobre a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em comparação com a soja amarela, o extrato metanólico de soja preta apresentou um tempo de inicialização da oxidação da LDL mais longo que o apresentado pela soja amarela. Além disso, o conteúdo de polifenóis totais foi maior na soja preta, sugerindo assim, que ela pode ser mais efetiva que a soja amarela na inibição da oxidação do LDL (TAKAHASHI *et al.*, 2005).

O extrato etanólico de grão de soja preta também apresentou ação inibitória potente sobre a agregação plaquetária e desenvolvimento de doenças trombóticas (KIM *et al*., 2011).

Potencial efeito antiobesidade foi atribuído a um peptídeo inibidor de adipogênese isolado e identificado a partir de hidrolisado de soja preta (KIM *et*

al., 2007). Também foram demonstrados, em estudo com ratos, os efeitos preventivos do extrato etanólico de casca de soja preta sobre a obesidade e intolerância à glicose por meio da regulação positiva de proteínas desacopladoras (UCPs) (KANAMOTO *et al*., 2011), envolvidas na regulação de peso corporal e regulação negativa da expressão inflamatória de citocinas no tecido adiposo (BOSCHINI e GARCIA JÚNIOR, 2005; KANAMOTO *et al*., 2011).

O interesse em elucidar os mecanismos pelos quais substâncias presentes na soja preta atuam prevenindo ou inibindo a formação e proliferação de células cancerosas também tem norteado diversas pesquisas (KIM *et al*., 2007; ZOU e CHANG, 2011).

Além disso, a demanda por mais estudos também vem sendo orientada pelo crescente interesse do consumidor por produtos que conciliem praticidade e benefícios à saúde (ITAL, 2016).

2.3 PROCESSAMENTO DE SOJA PRETA

Os produtos à base de soja preta representam um nicho de grande potencial a ser explorado e uma oportunidade de desenvolvimento de tecnologias e produtos de alto valor agregado considerando seu histórico de uso medicinal e os recentes estudos avaliando seus potenciais benefícios à saúde.

O processamento pode gerar alterações importantes na composição dos alimentos. Trabalhos recentes com alimentos tradicionais da cultura oriental como o *natto,* o *tempeh* e o tofu, elaborados a partir da soja preta, avaliaram a influência dos processos de torrefação (KIM *et al.*, 2011; SHIH *et al*, 2013), cozimento (XU e CHANG, 2008b; KIM *et al.*, 2011) e fermentação (FENG *et al.*, 2008; YAO, XIAO-NAN e DONG, 2010; LEE *et al.*, 2015) na alteração dos perfis de compostos bioativos e da atividade antioxidante de soja com tegumento preto.

Entretanto, carecem trabalhos sobre o uso da soja preta como matéria-prima na produção dos alimentos de soja de maior consumo no ocidente, a exemplo das bebidas e seus derivados.

2.3.1 Extrato de soja e extrato de soja preta

A legislação brasileira na década de 70 até início dos anos 2000, Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978, determinava que extrato de soja fosse o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial. Como produto resultante, o extrato de soja líquido deveria apresentar umidade máxima de 93%, mínimo de 3,0% de proteínas e 1,0% de óleo, e máximo de 2,8% de carboidratos e 0,6% de cinzas (BRASIL, 1978).

Essa resolução foi revogada pela RDC n° 268/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005), a qual define apenas que o extrato líquido de soja deve apresentar no mínimo 3% (3 g/100 g) de proteína. Essa nova diretriz permitiu outras possibilidades de produção do extrato de soja (uso de proteína isolada de soja e farinha micronizada) além dos extratos de soja líquidos e em pó obtidos de forma tradicional a partir do grão (CALLOU *et al*., 2010).

A composição centesimal do extrato de soja pode ser influenciada por fatores como a cultivar da soja, composição do grão, método de obtenção e fator de diluição utilizado no processamento (FELBERG, 1994).

Durante o processo de produção do extrato de soja é gerado um subproduto, após a etapa de filtração, denominado okara. Sua composição também depende da cultivar e processamento aplicado, apresentando quando seca, em geral, 25,4-28,4% de proteínas, 9,3-10,9% de óleo, 40,2-43,6% de fibras insolúveis, 12,6-14,6% de fibras solúveis e 3,8-5,3% de carboidratos solúveis (LIU, 2008).

Novos produtos comerciais, combinando extrato de soja hidrossolúvel ou proteína isolada de soja com sucos de frutas e saborizantes, têm obtido êxito no mercado mundial (BEHRENS e SILVA, 2004; DONKOR *et al*., 2007). Essa

variação de ingredientes resulta também em diferentes composições das bebidas. Um estudo realizado por Callou *et al.* (2010) analisou 65 bebidas de soja comercializadas no mercado brasileiro quanto ao seu conteúdo proteico. As amostras foram divididas em quatro grupos: bebidas contendo extrato de soja e sucos de frutas (grupo 1), bebidas contendo proteína isolada de soja e suco de frutas (grupo 2), bebidas contendo extrato de soja e saborizantes (grupo 3) e bebidas contendo proteína isolada de soja e saborizantes (grupo 4). Foi observada grande variação entre os grupos e também entre amostras de um mesmo grupo (Quadro 4).

As bebidas do grupo 4, caracterizadas pela ausência de sucos de frutas, apresentaram maiores conteúdos de proteínas, enquanto as bebidas adicionadas de sucos tiveram menores valores de proteínas uma vez que eles agem como diluentes da proteína de soja.

Quadro 4. Conteúdo de proteínas de bebidas à base de soja disponíveis no mercado brasileiro

Grupo de bebidas	Conteúdo de proteínas (g/200mL)
1	0,9-2,9
2	0,8-2,2
3	4,8-5,9
4	5,4-6,0

Vários foram os métodos de obtenção de extrato e bebidas de soja desenvolvidos ao longo dos anos. O método tradicional chinês para preparação de extrato de soja consiste basicamente de maceração em água fria por 8-12 horas, lavagem e trituração com água fria na proporção soja:água entre 1:8 e 1:10, seguida de filtração e cozimento (TANTEERATARM *et al*., 1999). Também tradicional, o método japonês apresenta uma pequena diferença do chinês pelo cozimento do extrato ser realizado antes da filtração, com a alegação de facilitar a extração e aumentar o rendimento.

Esses processos orientais tradicionais apresentam como vantagens a simplicidade e a facilidade de serem feitos em casa. Contudo, os extratos

obtidos apresentam sabor e aroma residuais não agradáveis ao paladar ocidental, além de resultarem em baixos rendimentos de produção (LIU, 1999).

Muitos processos de obtenção de extrato de soja foram estudados para melhorar suas características sensoriais, tornando-o mais adequado ao paladar ocidental, tais como uso de álcalis na água de maceração ou cozimento e trituração dos grãos em água quente (WILKENS *et al*.,1967; NELSON *et al*., 1976; TANTEERATARM *et al*., 1999; FELBERG *et al*. 2009), uso de outras matérias-primas tais como farinhas desengorduradas, concentrados e isolados proteicos (RODRIGUES *et al*., 2003), bem como o desenvolvimento de cultivares de soja especiais, principalmente em relação à redução dos teores de lipoxigenases (TORRES-PENARANDA & REITMEIER, 2001; CIABOTTI *et al*., 2006; EMBRAPA SOJA, 2017).

Dessa forma, os avanços tecnológicos e científicos empregados na obtenção do extrato e das bebidas de soja permitiram a melhoria de suas características sensoriais levando ao aumento do seu consumo no setor de alimentos à base de soja. Por outro lado, poucas informações estão disponíveis na literatura em relação a bebidas obtidas a partir de soja preta.

De Morais *et al*. (2014) elaboraram extrato de soja preta para preparação de queijos de soja tipo quark e petit suisse utilizando os seguintes parâmetros: proporção grão de soja:água igual a 1:8 (p/v), hidratação e pré-aquecimento a 80 °C por 10 minutos, seguido de trituração para obter o extrato e subsequente tratamento a 98 ± 2 °C por 5 minutos. Como resultado desse processamento, foi obtido um produto contendo compostos fenólicos e alta atividade antioxidante, reforçando a importância da presença da casca durante a produção do extrato de soja preta.

Chen *et al*. (2012) aumentaram o teor de isoflavonas agliconas em extrato de soja preta pela ação de *β*-glicosidases adicionadas. Para esse estudo, o extrato de soja foi obtido por trituração dos grãos de soja preta com água, filtração e autoclavação a 121 °C por 20 minutos.

Mais estudos são necessários para compreender o comportamento das antocianinas da soja preta frente às etapas de processamento do extrato.

2.4 BEBIDAS FERMENTADAS DE SOJA E DE SOJA PRETA

Os alimentos lácteos fermentados fazem parte da dieta humana em muitas regiões do mundo desde que o homem domesticou os animais. Historicamente, produtos derivados da fermentação de leite de vários animais apresentam maior período de conservação, permitindo o consumo de nutrientes do leite por um período de tempo consideravelmente mais longo do que o possível para o leite in natura (CHANDAN, 2006). Contudo foi somente no século 20 que pesquisadores identificaram os microrganismos responsáveis pela fermentação do iogurte e encontraram explicações para os benefícios associados ao seu consumo (FISBERG e MACHADO, 2015).

A idéia de fazer um iogurte de extrato de soja remonta de 1910, concebida pelo cientista chinês Li Yu-ying que fundou na França uma fábrica de alimentos de soja denominada Usine de la Caseo-Sojaine. A empresa lançou a primeira bebida de soja fermentada com culturas láticas comerciais, ainda que não se saiba quais culturas foram utilizadas (SHURTLEFF e AOYAGI, 2012).

Mais recentemente, a demanda por bebidas alternativas ao leite animal tem crescido no Ocidente devido a problemas como alergenicidade à proteína do leite, intolerância à lactose, interesse por redução de consumo de gorduras saturadas e procura por alternativas vegetarianas. Neste contexto, ocorre um crescimento no interesse por bebidas fermentadas à base de soja (FARNWORTH *et al*., 2007; ITAL 2010).

A fermentação, por ser uma técnica simples, de baixo custo e conhecida principalmente por melhorar as características sensoriais e nutricionais dos alimentos, pode contribuir para aumentar o consumo de bebidas de soja no Brasil. Ademais, além das propriedades funcionais atribuídas às bebidas lácticas fermentadas tradicionais, as bebidas fermentadas de soja apresentam vantagens adicionais, pois são naturalmente isentas de lactose, caseína e colesterol, além de apresentarem baixo teor de gordura saturada (COURI *et al*., 2006).

O processo de fermentação do extrato de soja é conduzido de forma semelhante ao processamento de leite fermentado. A fermentação do açúcar

faz com que ocorra a diminuição do pH, modificando a carga superficial das proteínas que se agregam formando uma rede que aprisiona a fase líquida e gotículas de gordura (FERRAGUT et al., 2009).

Na década de 70, os procedimentos para produção de extrato de soja fermentado consistiam na utilização de cultura mista de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, podendo ser adicionado também de *Lactobacillus acidophilus*. A inoculação da cultura deveria ser feita a temperaturas inferiores a 47 °C, para não eliminar os microrganismos, e em seguida o extrato deveria ser incubado entre 37 °C e 41 °C por 7 a 16 horas, até atingir pH próximo à 4 e aproximadamente 0,75% de ácido lático (SHURTLEFF e AOYAGI, 1979).

Ainda hoje *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* são os principais microrganismos utilizados na obtenção de bebida fermentada de soja (RINALDONI, CAMPDERRÓS e PADILLA, 2012; YE et al., 2013; MEI, FENG e LI, 2017). Entretanto, outras culturas láticas vêm sendo aplicadas, com destaque para a utilização de cepas probióticas (*Lactobacillus acidophillus*; *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum*), que podem conferir propriedades de saúde adicionais às bebidas de soja (ROSSI *et al*., 2011; LEE et al., 2015).

Por definição, probióticos são microrganismos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Segundo a FAO/WHO (2002), probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A maior parte dos efeitos positivos atribuídos aos microrganismos probióticos estão relacionados ao trato gastrointestinal. Diversas cepas de bactérias probióticas são capazes de modular temporariamente a microflora intestinal e inibir a colonização do intestino por potenciais patógenos, assim como evitar a translocação de bactérias patogênicas pela parede intestinal e a infecção de outros órgãos (DE VRESE e SCHREZENMEIR, 2008).

Durante a fermentação lática pode ocorrer a formação de acetaldeído e diacetil que conferem características sensoriais agradáveis, melhorando a aceitabilidade do extrato de soja. Além disso, o processo fermentativo pode

reduzir a quantidade dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose que, quando fermentados pela microflora presente no intestino, resultam na formação de dióxido de carbono, hidrogênio e metano levando à flatulência (ADETUNJI *et al*., 2006; CRUZ *et al*., 2009). Esses mesmos oligossacarídeos podem atuar como prebióticos favorecendo o desenvolvimento das bactérias láticas (BREN, DOS SANTOS, DE ALMEIDA, 2010; OLIVEIRA *et al*., 2010).

Quanto ao efeito da fermentação sobre os compostos fenólicos e atividade antioxidante da soja e produtos derivados, estudos mostraram que o processo fermentativo exerce efeitos positivos devido à habilidade de algumas bactérias láticas converterem as isoflavonas glicosídicas em suas agliconas bioativas. Essa transformação favorece a absorção intestinal, pois na maioria dos casos as agliconas são mais prontamente absorvidas a partir do intestino delgado do que suas contrapartes glicosídicas (BARNES *et al*., 2011).

Ainda são muito poucos os trabalhos encontrados sobre obtenção de extrato de soja preta fermentado. Chun *et al*. (2008) estudaram o efeito da fermentação em extrato de soja preta, amarela e combinação de ambos e avaliaram o conteúdo de isoflavonas, atividade antioxidante e características sensorias. Os extratos foram obtidos por maceração dos grãos durante a noite, descascamento dos grãos de soja amarela e manutenção da casca para a soja preta, trituração com água a 90°C, filtração, centrifugação e tratamento térmico a 121°C por 15 minutos. Quatro diferentes bebidas foram preparadas pela combinação de extrato de soja amarela:extrato de soja preta nas seguintes proporções: 100:0, 70:30, 50:50, 0:100, e subsequente fermentação por *Streptococcus. infantarius* 12 e *Weissella sp.* 4. O conteúdo de isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína) aumentou pela fermentação e a atividade antioxidante aumentou significativamente com o aumento do percentual de extrato de soja preta na mistura final. Em relação à avaliação sensorial, a bebida obtida com 100% de extrato de soja amarela apresentou os maiores valores para todos os atributos sensoriais. A bebida feita a partir de 100% de extrato de soja preta obteve os menores valores para os atributos de cor e textura.

Lee *et al*. (2015) avaliaram a influência de diferentes culturas iniciadoras sobre a conversão de isoflavonas glicosídicas em aglicona e sobre alterações

na atividade antioxidante durante a fermentação de extrato de soja preta. Assim como no trabalho de Chun *et al*. (2008) foi observada alta taxa de conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas e a atividade antioxidante do extrato fermentado foi superior à atividade do extrato não fermentado, tendo sido crescente ao longo de 24 horas de fermentação, para todas as culturas láticas estudadas.

Não foram encontrados estudos avaliando o efeito do processo de fermentação sobre o conteúdo de antocianinas do extrato de soja preta.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETUNJI, O. A.; BETIKU, E.; OJO, A.; SOLOMON, B.O. Effect of Some Selected Processing Routes on the Nutritional Value of Soy Yoghurt. Journal of Applied Sciences, v. 6, p. 527-530, 2006.

ANDRADE, J. C.; MANDARINO, J. M.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I., The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. Food Chemistry, v. 194, p. 1095-1101, 2016.

ASTAD, I. R.; PAICE, A. G. Black soybean (Glycine max L. Merril) seed's antioxidant capacity. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B. Nuts and seeds in health and desiese prevention. Elsevier Inc. p. 229-236, 2011.

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, Campinas, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.

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

BOSCHINI, R. P.; GARCIA JUNIOR, J. R. Regulação da expressão gênica das UCP2 e UCP3 pela restrição energética, jejum e exercício físico. Revista de Nutrição, Campinas, v. 18, n. 6, p. 753-764, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Regulamento Técnico de Padrão de Identidade e Qualidade para Farinha Desengordurada de Soja,

Proteína Texturizada de Soja, Proteína Concentrada de Soja, Proteína Isolada de Soja e Extrato de Soja. Brasília, DF,1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC N.º 2, de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Produtos Protéicos de Origem Vegetal. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília, DF, 2008.

BREN, E.; DOS SANTOS, L.; DE ALMEIDA, J. V. P. Desenvolvimento de bebida probiótica a partir de extrato solúvel de soja. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 4, n. 1, p. 100-108, 2010.

CALLOU, K. R. A.; SADIGOV, S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Isoflavones and antioxidante capacity of comercial soy-based beverages: effect of storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, p. 4284-4291, 2010.

CHANDAN, R. C. History and consumption trends. In: CHANDAN, R. C. (Ed.) Manufacturing yogurt and fermented milks. USA. Blackwell Publishing Ltd. p. 3-16, 2006.

CHEN, K. I.; LO, Y. C.; SU, N. W.; CHOU, C. C.; CHENG, K. C., Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by immobilized beta-glucosidase on solid carriers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.60, n. 51, p. 12540-12546, 2012.

CHEN, K.-I.; YAO, Y.; CHEN, H.-J.; LO, Y.-C.; YU, R.-C.; CHENG, K.-C., Hydrolysis of isoflavone in black soy milk using cellulose bead as enzyme immobilizer. Journal of Food and Drug Analysis, v. 24, n. 4, p. 788-795, 2016.

CHO, K. M.; HA, T. J.; LEE, Y. B.; SEO, W. D.; KIM, J. Y.; RYU, H. W.; JEONG, S. H.; KANG, Y. M.; LEE, J. H. Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* L.) cultivars with variying seed coat colours. Journal of functional foods, v. 5, n. 3, p. 1065-1076, 2013.

CHOUNG, M. G.; BAEK, I. Y.; KANG, S. T.; HAN, W. Y.; SHIN, D. C.; MOON, H. P.; KANG, K. H., Isolation and determination of anthocyanins in seed coats

of black soybean (Glycine max (L.) Merr.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 12, p. 5848-5851, 2001.

CHUN, J.; KWON, D. Y.; KIM, J. S.; KIM, J. H., Sensory properties of soy yoghurts prepared from yellow and black soymilk using Streptococcus infantarius 12 and Weisellia sp. 4. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 88, n. 10, p. 1845-1849, 2008.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, 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 Agrotecnológica, v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006.

COURI, S.; FELBERG, I.; TERZI, S.; SILVA, C.S. Bebida fermentada de soja. Embrapa Informação Tecnológica, (agroindústria familiar). Brasília, DF, 2006.

CRUZ, N. S.; CAPELLAS, M.; JARAMILLO, D. P.; TRUJILLO, A. J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V., Soymilk treated by ultra high-pressure homogenization: Acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product. Food Hydrocolloids, v. 23, n. 2, p. 490-496, 2009.

DAMODARAN, S.; KIRK, P.; FENNEMA, O.R. Fennema's Food Chemistry. 4a ed. CRC Press, 2008. 1160 p.

DE MORAES FILHO, M. L., HIROZAWA, S. S., PRUDENCIO, S. H., IDA, E. I., GARCIA, S. *Petit Suisse* from black soybean: bioactive compounds and antioxidant properties during development process. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v.65, p.470-475, 2014.

DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J., Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, v. 111, p. 1-66, 2008.

DO, K.; JEUN, J.; HOUNG, S-J.; JUN, H-J.; LEE, J. H.; JIA, Y.; LEE, S-J. Soybean (Glycine max L. Merr.) hexane extracts inhibit cellular fatty acid uptake by reducing the expression of fatty acid uptake by reducing the expression of fatty acid transporters. Food Science and Biotechnology, v. 20, n.1, p. 237-242, 2011.

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

EMBRAPA SOJA. Soja na Alimentação. Londrina, 2017. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php>. Acesso em: 20 AGO. 2017.

FAO/WHO. Joint of FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London Ontário, Canadá, April 30 and May 1, 2002.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M. P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C., Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. International Journal of Food Microbiology, v. 116, n. 1, p. 174-181, 2007.

FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S. C.; MODESTA, R. C. D. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.29, n.3, p. 609-617, 2009.

FELBERG, I. Mistura em pó para bebida à base de extrato de soja e café solúvel: elaboração, caracterização química, avaliação sensorial e biodisponibilidade das isoflavonas. Tese de doutorado, Rio de Janeiro-RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

FENG, S.; SAW, C. L.; LEE, Y. K.; HUANG, D., Novel process of fermenting black soybean (*Glycine max* (L.) Merril)] yogurt with dramatically reduced flatulence-causing oligosaccharides but enriched soy phytoalexins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 21, p. 10078-10084, 2008.

FERRAGUT, V.; CRUZ, N. S.; TRUJILLO, A.; GUAMIS, B.; CAPELLAS, M., Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk. Journal of Food Engineering, v. 92, n. 1, p.63-69, 2009.

FISBERG, M.; MACHADO, R. History of yogurt and current patterns of consumption. Nutrition Reviews, v. 73, p. 4-7, 2015.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 5987-5993, 2002.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, [S.l.], v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.24, n. 4, p.582-586, 2004.

HA, T. J.; LEE, J. H.; SHIN, S.-O.; SHIN, S.-H.; HAN, S.-I.; KIM, H.-T.; KO, J.-M.; LEE, M.-H.; PARK, K.-Y., Changes in anthocyanin and isoflavone

concentrations in black seed-coated soybean at different planting locations. Journal of Crop Science and Biotechnology, v. 12, n. 2, p. 79-86, 2009.

HONG, G. E.; MANDAL, P. K.; LIM, K. W.; LEE, C. H., Fermentation increases isoflavone aglycone contents in black soybean pulp. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 7, n. 6, p. 502-511, 2012.

HUNG, Y. H.; HUANG, H. Y.; CHOU, C. C., Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybeans. International Journal of Food Microbiology, v. 118, n. 1, p. 62-68, 2007.

ITAL. Brasil beverage trends 2020. REGO, R. A.; MADI, A. L. F. C. (Ed.). Campinas : ITAL, 2016. 302 p.

JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. 2002.

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, n.4, p.1112-1116, 2010.

KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 628-633, 2003.

KANAMOTO, Y.; YAMASHITA, Y.; NANBA, F.; YOSHIDA, T.; TSUDA, T.; FUKUDA, I.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; ASHIDA, H. A black soybean seed coat extract prevents obesity and glucose intolerance by up-regulating upcoupling proteins and down-regulating inflammatory cytokines in high-fat diet-fed mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 8985-8993, 2011.

KANG, J.; BADGER; T. M.; RONIS M.J. J.; WU, X. Non-isoflavone Phytochemicals in Soy and Their Health Effects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 14, p. 8119-33, 2010.

KIM, S.L.; KIM, H.B. CHI, H.Y.; KIM, S.J. Variation of anthocyanins and isoflavones between yellow-cotyledon and green-cotyledon seeds of black soybean. Food Science and Biotechnology, v. 14, n. 6, p.778-782, 2005.

KIM, J.-A.; HONG, S.-B.; JUNG, W.-S.; YU, C.-Y.; MA, K.-H.; GWAG, J.-G.; Chung, I.-M., Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. Food Chemistry, v. 102, n. 3, p. 738-744, 2007.

KIM, J. M.; KIM, J. S.; YOO, H.; CHOUNG, M. G.; SUNG, M. K., Effects of black soybean [Glycine max (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation in vitro and in vivo. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 18, p. 8427-8433, 2008.

KIM, K.; LIM, K.-M.; KIM, C.-W.; SHIN, H.-J.; SEO, D.-B.; LEE, S.-J.; NOH, J.-Y.; BAE, O.-N.; SHIN, S.; CHUNG, J.-H., Black soybean extract can attenuate thrombosis through inhibition of collagen-induced platelet activation. The Journal of Nutritional Biochemistry, v. 22, n. 10, p. 964-970, 2011.

KOH, K.; YOUN, J. E.; KIM, H-S. Identification of anthocyanins in black soybean (Glycine max (L.) Merr.) varieties. Journal of Food Science and Technology, v. 51, n. 2, p. 377-381, 2014.

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. K.; PRATAP, D. BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. Food Research International, v.43, n.1, p.323-328, 2010.

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.; HWANG, Y. S.; CHANG, W. S.; MOON, J. K.; CHOUNG, M. G. Seed Maturity differentially mediates metabolic responses in black soybean. Food Chemisry. v .141, p.2052-2059, 2013.

LEE, M.; HONG, G.-E.; ZHANG, H.; YANG, C.-Y.; HAN, K.-H.; MANDAL, P. K.; LEE, C.-H. Production of the isoflavone aglycone and antioxidant activities in black soymilk using fermentation with Streptococcus thermophilus S10. Food Science and Biotechnology, v. 24, n. 2, p. 537-544, 2015.

LIU, K. (2008). Food Use of Whole Soybeans. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. (Ed.) Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization. Urbana, Illinois: AOCS Press. p. 441-481, 2008.

LIU, K. Nonfermented oriental soyfoods. In LIU, K. (Ed.). Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization. New York: Aspen Publishers, 1999. 532p.

LIU, K. Soybean as a powerhouse of nutrients and phytochemicals. In: LIU, K. (Ed.) Soybeans as functional foods and ingredients. Champaign, Illinois: AOCS Press. p. 1-22, 2004.

MEI, J.; FENG, F.; LI, Y., Effective of different homogeneous methods on physicochemical, textural and sensory characteristics of soybean (*Glycine max* L.) yogurt. CyTA - Journal of Food, v. 15, n. 1, p. 21-26, 2017.

MUNROE, I.; HARWOOD,M.; HLYWKA, J. STEPHEN, A.M.; DOULL, J.; FLAMM, G. ADLERCREUTZ, H. Soy isoflavones: A safety review. Nutritions Reviews, Malden, Mass, v. 61, n. 1, p.1-33, 2003.

NELSON, A.I.; STEINBERG, M.P.; WEI, L.S. Illinois process for preparation of soymilk. Journal of Food Science, Chicago, Ill., v. 41, n. 1, p.57-61, 1976.

OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; LEITE, R. S.; CAMPOS FILHO, P. J.; VICENTINI, M. B. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/cultivares de soja (Glycine Max (L) Merril especiais utilizados para alimentação humana. Brazilian Journal of Food Technology, v. 13, p. 23-29, 2010.

PEREIRA, J. N. Avaliação de diferentes linhagens de soja preta quanto as suas características físico-químicas, nutricionais e compostos bioativos. Dissertação de mestrado, Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2015.

PIMENTEL, C. V. M.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. Alimentos funcionais: Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo-SP, Livraria Varela Ed. 95 p. 2005.

QIU, L-J.; CHANG, R-Z. (2010). The origin and history of soybean. In: SINGH, G. (Ed.) The soybeans botany, production and uses. Cambridge, MA: CABI. p. 345-460, 2010.

REZENDE, D. F. Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da soja preta e amarela. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2012.

RINALDONI, A. N.; CAMPDERRÓS, M. E.; PÉREZ PADILLA, A. Physico-chemical and sensory properties of yogurt from ultrafiltreted soy milk concentrate added with inulin. LWT - Food Science and Technology, v. 45, n. 2, p. 142-147, 2012.

RODRIGUES, R. S.; GOZZO, A. M.; MORETTI, R.H. Comportamento reológico de extratos de grãos, farinha integral e isolado protéico de soja. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Paraná, v. 21, n. 2, p.367-378, 2003.

ROSSI, E. A.; CAVALLINI, D. C. U.; MANZONI, M. S. J.; ROSSI, P. R. Produtos probióticos e prebióticos à base de soja. In: SAAD, S. M. I.; DA

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Probióticos e prebióticos em alimentos. São Paulo-SP, Livraria Varela. p. 541-563, 2011.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K.; SAHOO, D. (2010). Bioactive molecules in fermented soybean products and their potential health benefits. In: RAY, R. C.; MONTET, D. (Ed.) Fermented Foods, Part II: Technological Interventions. CRC Press. 525 p., 2017.

SHIH, M. C.; YANG, K. T.; KUO, S. J., Quality and antioxidative activity of black soybean tofu as affected by bean cultivar. Journal of Food Science, v. 67, n. 2, p. 480-484, 2002.

SHIH, M. C.; YANG, K. T.; SU, S. Y.; TSAI, M. L. Optimization process of rosted broken black soybean natto using response surface method. Journal of Food Processing and Preservation, v. 37, n. 5, p. 474-482, 2013.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. Tofu and Soymilk Production. Soyinfo Center. p. 165, 1979.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. History of soy yogurt, soy acidophilus milk and other cultured soymilks (1918-2012). USA. Soyinfo Center. p. 590, 2012.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. Revista Nutrição, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.

SLAVIN, M.; KENWIRTHY, W.; YU, L. L. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of Maryland-grown soybeans with colored seed coats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 11174-11185, 2009.

TAKAHASHI, R.; OHMORI, R.; KIYOSE, 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.

TANTEERATARM, K.; NELSON, A.I.; WEI, L.S. Manufacturing of bland soymilk. In: WILLIAMS, S.W. Soybean processing for food uses. Urbana: INTSOY, 1999. p.154 -164.

TORRES-PENARANDA, A.V.; REITMEIER, C.A. Sensory descriptive analysis of soymilk. Journal of Food Science, Chicago, Ill., v. 66, n. 2, p. 352-356, 2001.

TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration and physiological effects. In: CARRÃO-PANIZZI, M. C. Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana. Londrina-PR, 2001.

USFDA. Food labeling:Health claims. Soy protein and coronary heart disease (CHD). 21 CFR part 101.82. Federal Register 64:57699, v. 64, n. 206, October 26, 1999.

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, D.; MA, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, X. Thermal characterization of the anthocyanins from black soybean (Glycine max L. Merrill) exposed to thermogravimetry. Food Science and Technology, v.55, p. 645-649, 2014.

WILKENS, W.F.; MATTICK, L.R.; HAND, D.B. Effect of processing method on oxidative off-flavors of soybean milk. Food Technology, Chicago, Ill., v. 21, n. 12, p.1630-1633, 1967.

WILLIAMS, LF.(1950). Structure and genetic characteristics of the soybean. In: MARKLEY, K. (Ed.). Soybeans and Soybean Products. New York, NY, Interscience Publisher, INC. p.111-134, 1950.

GANESAN, K.; XU, B., A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. Nutrients, v. 9, n. 5, 2017.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Antioxidante capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybean in relation to their distribution of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 8365-8373, 2008a.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 7165-7175, 2008b.

YE, X. J.; NG, T. B. Antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities of a hemagglutinin and a protease inhibitor from mini-black soybean. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. v.2011, 12 p.

YAO, Q.; XIAU-NAN, J.; DONG, P.H. Comparison of antioxidante activities in black soybean preparations fermented with various microorganisms. Agricultural Sciences in China. v. 9, n. 7, p. 1065-1071, 2010.

YE, M.; REN, L.; WU, Y.; WANG, Y.; LIU, Y. Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt. Food Science and Technology. v.51, p. 314-318, 2013.

YUAN, S.; CHANG, S. K-C. Selected Odor Compounds in Soymilk As Affected by Chemical Composition and Lipoxygenases in Five Soybean Materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 426-431, 2007.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y.; TANG, X. J.; DENG, Y. Y.; CHI, J. W. Phenolic Composition and Antioxidant Activity in Seed Coats of 60 Chinese Black Soybean (Glycine max L. Merr.) Varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 59, p. 5935-5944, 2011.

ZOU, Y.; CHANG, S. K. C. Effect of black soybean extract on the suppretion of the proliferation of human AGS gastric cancer cells via the induction of apoptosis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 59, p. 4597-4605, 2011.

CAPITULO 3 TESTES PRELIMINARES PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE SOJA PRETA UTILIZANDO METODOLOGIAS DESCRITAS OU ADAPTADAS DA LITERATURA

3.1 INTRODUÇÃO

Dentre os produtos derivados da soja, o extrato de soja se apresentou como o de mais fácil inclusão no mercado ocidental, destacando-se como um produto de alto valor nutritivo, pronto para beber e de custo relativamente baixo (FELBERG *et al*., 2009). As bebidas de soja foram o grande destaque da inclusão de produtos derivados da soja no mercado ocidental devido à praticidade e conveniência com que foram incorporadas no hábito alimentar desta população (SOARES, 2011). Anteriormente mais restrita ao consumo de um público específico como as pessoas com intolerância à lactose, vegetarianos e indivíduos com restrições alimentares, tornou-se um produto consumido pela população em geral, que pode ser encontrado de diversas marcas e sabores no mercado brasileiro (ITAL, 2016).

Essas bebidas podem ser tecnologicamente processadas, tanto a partir do grão como de outros derivados. A Resolução RDC n° 91, de 18 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000) estabelece como ingredientes obrigatórios nas bebidas de soja o extrato de soja (integral e/ou desengordurado) e/ou proteína concentrada de soja e/ou proteína isolada de soja e/ou proteína texturizada de soja e/ou outras fontes proteicas de soja, excluindo o farelo tostado de soja. Farinhas de soja e grãos de soja "in natura" somente podem ser utilizadas quando inativados ou quando o processo tecnológico de fabricação do produto garantir a inativação das enzimas.

O extrato de soja é uma emulsão líquida obtida por processamento adequado, resultando em um produto com aparência semelhante ao leite de vaca, porém diferente em sabor e composição (POLISELI-SCOPEL *et al*., 2012). O extrato de soja oriental tradicional é obtido por maceração da soja, moagem em água fria, filtração para remover resíduos insolúveis e cozimento para reduzir antinutrientes e inativar as lipoxigenases, enzimas cuja atividade

resulta em compostos que conferem sabor residual de grão (TAN, CHANG, ZHANG, 2016).

Apesar dos reconhecidos benefícios da soja, seu consumo ainda é baixo em países ocidentais. De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR), o volume de produção de bebidas de soja no mercado brasileiro em 2015 foi de, aproximadamente, 20,7 milhões de litros e o consumo per capita de 1,0 litro. Dentre as razões para o baixo consumo de extrato de soja destaca-se o sabor residual de grão (AL MAHFUZ *et al.,*

2004). Muitos esforços têm sido realizados para eliminar ou minimizar o sabor residual no extrato de soja, dentre os quais o uso de tecnologias simples, como o branqueamento e a moagem com água quente para reduzir efetivamente a formação de compostos de oxidação e, consequentemente, aumentar a aceitação dos consumidores (TANTEERATARM, NELSON, WEI, 1999; BENETTI; FALCÃO, 2003; LV; SONG, 2011).

Existe ainda carência de informações na literatura sobre como os métodos usualmente utilizados no processamento do extrato de soja amarela podem afetar a qualidade do extrato de soja preta. Portanto, esta parte do trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das condições de processamento na obtenção de extrato de soja preta por meio da avaliação do perfil e teor das antocianinas nos extratos obtidos a partir de cinco diferentes processos descritos ou adaptados da literatura.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Matérias-Primas

Duas sojas pretas (comercial e linhagem desenvolvida pela Embrapa) foram utilizadas como matérias-primas e, por esta razão, o estudo de obtenção dos extratos foi conduzido em duas fases independentes (Fase I e Fase II).

Na Fase I, foram utilizados grãos de soja preta adquiridos no comércio varejista da cidade de São Paulo, referidos neste estudo como $SP_{comercial}$, pois não houve disponibilidade da matéria-prima objeto do estudo (soja preta (*Glycine max* (L.) Merrill), linhagem BRM 09-50995) no início do projeto devido a questões agronômicas de época de colheita.

A Fase II foi iniciada assim que a soja preta, linhagem BRM 09-50995, desenvolvida pelo programa de melhoramento de soja para alimentação humana da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e colhida na safra 2013, foi disponibilizada para o estudo ($SP_{Embrapa}$).

Tanto a $SP_{comercial}$ quanto a $SP_{Embrapa}$ apresentavam o tegumento externo preto e o cotilédone amarelo (Figura 4).

Figura 4. Soja com tegumento preto e cotilédone amarelo.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Fase I

Nesta fase, foram testados três processos, convencionalmente utilizados na produção de extrato de soja amarela, para a obtenção de extrato de soja preta (Figura 5). O processo 1 foi o tradicional Chinês, no qual se utiliza água fria durante todo o processo e somente ao final o extrato passa por tratamento térmico (TANTEERATARM, NELSON, WEI, 1999). O processo 2 consistiu das mesmas etapas do processo 1, contudo a lavagem dos grãos macerados e posterior trituração foi realizada com água em ebulição (BENASSI, YAMASHITA, PRUDENCIO, 2011). No processo 3, o cozimento dos grãos foi realizado em solução alcalina (NELSON, STEINBERG, WEI 1976; FELBERG et al., 2009).

Com o objetivo de observar o efeito da etapa de pasteurização sobre o teor de antocianinas, as amostras de extrato de soja preta foram colhidas

imediatamente antes e após a etapa de pasteurização para todos os processamentos estudados totalizando seis experimentos. Todas as bebidas foram liofilizadas e conservadas a -18°C para posterior análise.

(A)	(B)	(C)
Soja Preta *comercial*	***Soja Preta*** *comercial*	***Soja Preta*** *comercial*
↓	↓	↓
Lavagem	Lavagem	Lavagem
↓	↓	↓
Maceração	Maceração	Maceração
↓	↓	↓
Drenagem	Drenagem	Drenagem
↓	↓	↓
Lavagem a frio	Lavagem a quente	Lavagem a quente
↓	↓	↓
Drenagem	Drenagem	Drenagem
↓	↓	↓
Trituração a frio	Trituração a quente	Cozimento c/ $NaHCO_3$
↓	↓	↓
Centrifugação	Centrifugação	Drenagem
↓	↓	↓
Extrato de soja preta (A*)	***Extrato de soja preta***	Trituração a quente
↓	↓	↓
Pasteurização	Pasteurização	Centrifugação
↓	↓	↓
Resfriamento	Resfriamento	***Extrato de soja preta***
↓	↓	↓
Extrato de soja preta (D*)	***Extrato de soja preta (D*)***	Pasteurização
		↓
		Resfriamento
		↓
		Extrato de soja preta (D*)

Figura 5. Processos para obtenção de extrato de soja preta testados na Fase I. (A) Processo 1; (B) Processo 2; (C) Processo 3. A*: antes da pasteurização. D*: depois da pasteurização.

O detalhamento de cada uma das operações unitárias utilizadas nos processos 1 a 3 está descrito a seguir:

- Maceração: intumescimento do grão em água fria em temperatura de refrigeração (8 °C ± 2) por 16 horas;
- Drenagem: Escoamento da água;
- Lavagem a frio: Imersão da soja em água em temperatura ambiente por 2 min;
- Lavagem a quente: Imersão da soja em água à ebulição por 2 min;
- Trituração a frio: Trituração da soja com água em temperatura ambiente (1:8 soja:água);
- Trituração a quente: Trituração da soja com água em ebulição (1:8 soja:água);
- Cozimento com $NaHCO_3$: Cozimento da soja com solução de $NaHCO_3$ (0,25%) em ebulição por 10 min;
- Centrifugação: Separação do extrato solúvel do resíduo (okara) por processo de centrifugação (IEC Model K7165; filtro de nylon 150 µm; V = 4000 rpm; t = 5 min);
- Pasteurização: Tratamento térmico do produto final a 98 °C por 10 min.

Análise de antocianinas na $SP_{comercial}$ e extratos obtidos nos processos 1 a 3

Para análise de antocianinas da $SP_{comercial}$ e dos extratos dela obtidos, a extração foi realizada conforme Santiago *et al*. (2010). A análise cromatográfica foi conduzida em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, com detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996, software Empower®, utilizando coluna Thermo® BDS HYPERSIL C_{18} (4,6×10mm, 2,4 µm), mantida a 40 ˚C, e gradiente de ácido fórmico 5% e acetonitrila como fase móvel, com fluxo de 1,0 mL/min e 20 µL de injeção. A quantificação foi realizada por padronização externa, por meio da elaboração de curva analítica com padrões das antocianinas delfinidina-3-

glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo, isolados segundo Gouvêa *et al*. (2012).

3.2.2.2 Fase II

Em função dos resultados obtidos na Fase I, foi verificada a necessidade de avaliar outros métodos para o processamento do extrato de soja preta. Desta forma, nesta segunda fase do estudo, o aproveitamento integral do líquido de cozimento e o uso de temperatura inferior à de ebulição foram testados, conforme a metodologia utilizada por De Moraes Filho *et al*. (2014) (processo 4) apresentado na Figura 6 (A). Além disso, uma etapa prévia de moagem dos grãos $SP_{Embrapa}$ foi incorporada à esta metodologia para avaliar a influência do aumento da superfície de contato sobre a extração das antocianinas, configurando no processo 5 apresentado Figura 6 (B). Os dois estados iniciais da matéria-prima, soja preta em grão e moída, estão representadas na Figura 7.

Para todos os processamentos estudados, amostras foram colhidas imediatamente antes e depois da etapa de pasteurização com o objetivo de observar o efeito desta etapa específica sobre o teor de antocianinas, totalizando quatro experimentos. Todas as bebidas foram liofilizadas e conservadas a -18°C para posterior análise.

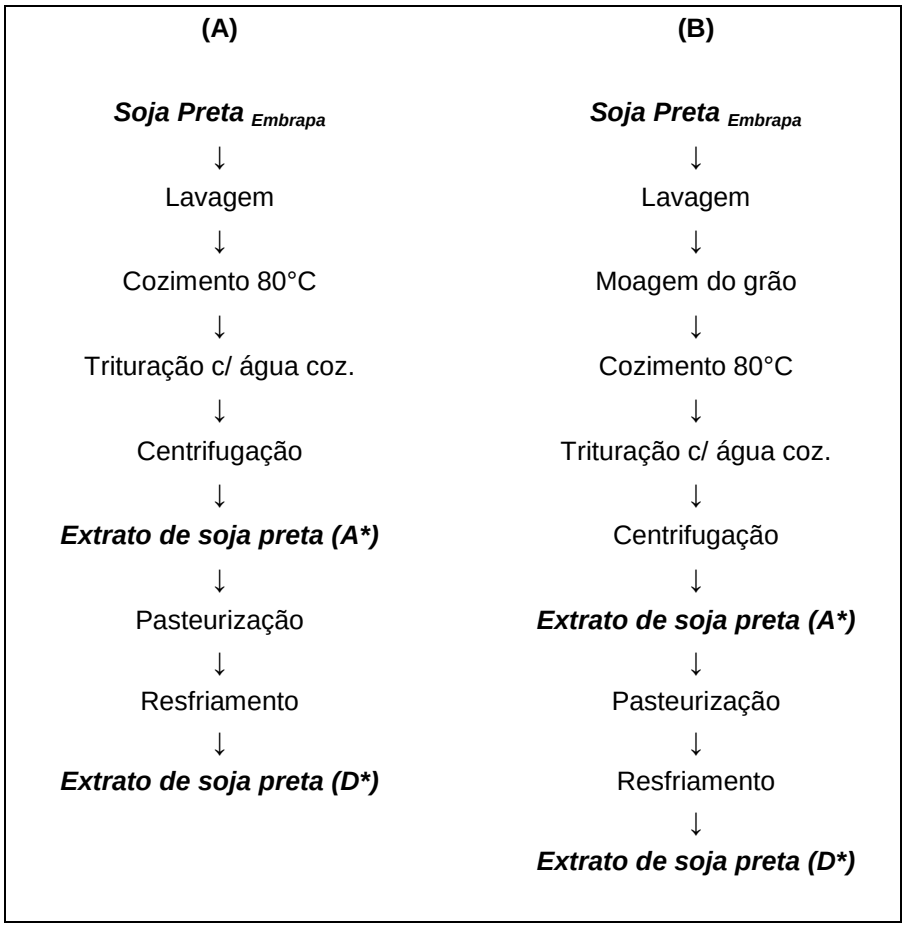


Figura 6. Processos para obtenção de extrato de soja preta testados na Fase II. (A) Processo 4; (B) Processo 5. A*: antes da pasteurização. D*: depois da pasteurização.

O detalhamento de cada uma das operações unitárias utilizadas nos processos 4 e 5 está descrito a seguir:

- Moagem do grão: moagem dos grãos de $SP_{Embrapa}$ em moinho martelo (Perten Laboratory Mill 3100) com peneira de 0,8 µm;
- Cozimento 80°C: cozimento da matéria-prima com água (1:8 m/m) à temperatura de 80°C por 10 min.
- Trituração com água do cozimento: Trituração da mistura soja+água em um processador Waring® Blender por 2 min. (Figura 7 B);
- Centrifugação: Separação do extrato solúvel do resíduo (okara) por processo de centrifugação (IEC Model K7165; filtro de nylon 150 µm; V = 4000 rpm; t = 5 min);

- Pasteurização: Tratamento térmico do produto final, T = 98 ˚C; t = 10 min.

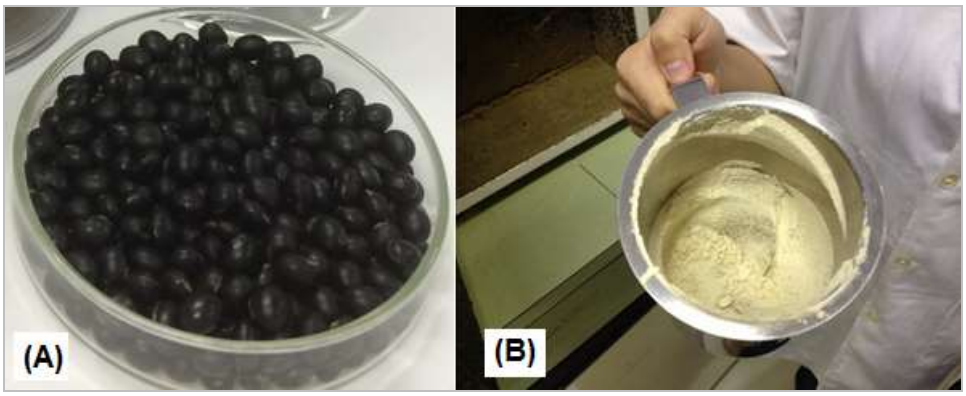


Figura 7. Soja preta em grãos (A) e soja moída (B).

Análise de antocianinas na $SP_{Embrapa}$ e extratos obtidos nos processos 4 e 5

Frente à dificuldade observada para extração de antocianinas das amostras pela metodologia empregada durante a Fase I, verificou-se a necessidade de estudar métodos mais adequados de extração para análise de antocianinas da soja preta. Em trabalho desenvolvido por Pereira *et al*. (2014) utilizando a mesma linhagem de soja $SP_{Embrapa}$, foram comparadas quatro metodologias de extração de antocianinas de soja preta descritas na literatura, com variações em termos de tempo e temperatura (50 °C/1h; 4 °C/24h; 4 °C/48h e 100 °C/30 min). O conteúdo de antocianinas totais encontrado nos extratos obtidos a 50 °C /1 hora; 4 °C /24 horas; 4 °C /48 horas e 100 °C /30 min foi de 757, 615, 432 e 155 mg/100g de casca, respectivamente.

Com base nesses resultados, foi adotada a metodologia de extração a 50 °C/1h (WANG et al., 2014), com as adaptações descritas em Pereira *et al*. (2014). Amostras de 1 g do grão e dos extratos foram adicionadas à solução de metanol/água/ácido clorídrico (60:39:1), em banho-maria a 50 °C por 1 hora, com agitação em vórtex a cada 5 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada (SORVAL LEGEND Centrifuge XRT) a 12.000 RPM por 10 min a 25°C. O sobrenadante foi completado a 50 mL (balão volumétrico) com solução

de extração, filtrado através de membrana PTFE (CHROMAFIL Xtra – 45/25, poro 0,45µM, filtro-Ø:25 mm) e armazenado em frasco âmbar a -18°C. As amostras foram feitas em duplicata.

Para determinação do teor de antocianinas, uma alíquota de 1 mL do extrato foi seca com ar comprimido, sendo a mesma ressuspensa em metanol e ácido fórmico para análise cromatográfica. A análise cromatográfica foi realizada conforme já descrito para a Fase I.

3.3 RESULTADOS

Três antocianinas foram identificadas tanto na $SP_{comercial}$ quanto na $SP_{Embrapa}$: delfinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo, sendo a cianidina-3-glicosídeo a antocianina majoritária. Estas também foram as mesmas antocianinas identificadas por Koh *et al*. (2014) nas duas variedades de soja preta analisadas. Os resultados estão de acordo também com os encontrados por Zhang *et al*. (2011) que avaliaram a composição de antocianinas da casca de 60 sojas pretas de origem Chinesa e embora tenham identificado a presença de 6 diferentes antocianinas, verificaram que a cianidina-3-glicosídeo foi a mais abundante em todas as variedades estudadas.

Diferentemente do que ocorreu para os grãos de soja preta, as amostras de extrato de soja preta apresentaram diferentes perfis devido à perda de antocianinas durante o processamento. Os resultados dos grãos e dos extratos correspondentes serão apresentados em função das Fases I e II do estudo.

3.3.1 Fase I

O primeiro e o terceiro processo (Tabela 1) mostraram-se absolutamente inadequados para o processamento de extrato de soja preta, com a completa degradação das antocianinas. No processo 1, a drenagem da água de maceração foi uma etapa de perda considerável de antocianinas e a trituração a frio subsequente não permitiu que houvesse uma extração eficaz das antocianinas do grão para a solução. Por outro lado, no processo 3, o

cozimento em solução alcalina favoreceu a solubilização das antocianinas, uma vez que a aplicação de calor é a base de muitas técnicas de extração de compostos bioativos (AZMIR et al., 2013), porém, a etapa seguinte de drenagem resultou na total perda destes compostos.

Tabela 1. Perfil e teor de antocianinas presentes no grão de $SP_{comercial}$ e nos extratos de soja preta obtidos a partir dos processos avaliados na Fase I

Amostra[§]	Antocianinas (mg/100g, BS**)			
	Delfinidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo	Petunidina-3-glicosídeo	Total
Grão de $SP_{comercial}$	0,14	39,41	0,57	40,12
Extrato de soja preta 1-A	ND*	0,36	ND*	0,36
Extrato de soja preta 1-D	ND*	0,15	ND*	0,15
Extrato de soja preta 2-A	ND*	22,99	ND*	22,99
Extrato de soja preta 2-D	ND*	12,89	ND*	12,89
Extrato de soja preta 3-A	ND*	ND*	ND*	ND*
Extrato de soja preta 3-D	ND*	ND*	ND*	ND*

ND*: não detectado, valor menor que o limite de detecção do instrumento. BS**: base seca. [§] Extratos de soja obtidos a partir dos processos 1, 2 e 3. A: antes da pasteurização. D: depois da pasteurização.

Na Figura 8, é possível observar a cor da solução obtida após a etapa de maceração e após a etapa de cozimento com bicarbonato. A solução após o cozimento (Figura 8 B) ficou muito mais escura do que a resultante da maceração (Figura 8 A) sugerindo uma maior solubilização das antocianinas em função do calor aplicado.

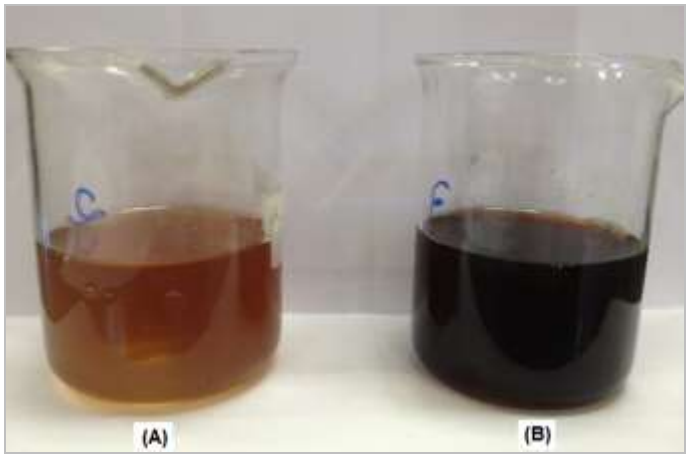


Figura 8. (A) água de maceração; (B) água de cozimento.

As amostras de extratos de soja preta obtidas no processo 2 (Figura 5), no entanto, apresentaram uma quantidade considerável de antocianinas (50% do teor inicial do grão) em comparação com os outros dois processos. Perdas ocorreram em função das etapas de drenagem após a maceração e a lavagem a quente, contudo, a trituração a quente parece ter favorecido a extração de antocianinas para a solução. Este favorecimento pode ser explicado pelo fato de, geralmente, temperaturas mais altas aumentarem as taxas de difusão e dissolução do soluto no solvente (FELLOWS, 2006). Contudo, a temperatura de extração pode ser limitada em função da degradação dos compostos extraídos (PRASAD *et al*., 2011).

Em relação ao tratamento térmico, a pasteurização mostrou ter um efeito negativo sobre a estabilidade das antocianinas (Tabela 1) em todos os processos estudados, reduzindo seu conteúdo em quase metade em relação ao extrato não pasteurizado, e confirmando a influência da exposição ao aquecimento sobre a degradação das antocianinas. De fato, a degradação de antocianinas tem sido observada quando estas são submetidas a tratamento térmico, uma vez que são compostos termo sensíveis (QUEIROZ *et al*., 2009; OLIVEIRA *et al*., 2010). Corroborando com esses resultados, Sarkis *et al*. (2013) avaliaram o efeito do aquecimento na degradação das antocianinas durante o processamento da polpa de mirtilo e concluíram que a magnitude e a duração do processo de aquecimento têm uma forte influência na estabilidade desses pigmentos.

3.3.2 Fase II

Os resultados obtidos na Fase I revelaram que a migração das antocianinas da casca para o líquido não ocorreu de maneira eficaz à temperatura ambiente, e grande parte das antocianinas foram perdidas pela drenagem dos líquidos após a maceração e cozimento dos grãos. Em função desses conhecimentos adquiridos na Fase I, novos processos com a utilização de temperatura inferior à temperatura de ebulição e não descarte de líquidos

foram testados. Os resultados da quantificação de antocianinas nas amostras estudadas na Fase II estão apresentados na Tabela 2.

O uso de grãos moídos para obtenção de extrato de soja preta apresentou vantagens em relação ao uso de grãos inteiros, confirmando que um aumento na relação superfície/volume do alimento favoreceu a extração de antocianinas do grão para a solução. Embora a influência do tamanho de partícula não tenha sido previamente avaliada para o processamento de extrato de soja preta, Luthria *et al*. (2008) encontraram um maior rendimento de extração de compostos fenólicos em salsa em forma de flocos devido a uma maior área superficial por unidade de massa ter facilitado a acessibilidade do analito ao solvente de extração.

Tabela 2. Perfil e teor de antocianinas presentes na $SP_{Embrapa}$ e dos extratos de soja preta obtidos a partir dos processos avaliados na Fase II

Amostra[§]	Antocianinas (mg/100g, BS**)			
	Delfinidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo	Petunidina-3-glicosídeo	Total
$SP_{Embrapa}$	16,74	42,39	6,45	65,58
Extrato de soja preta 4-A	4,38	36,63	4,40	45,41
Extrato de soja preta 4-D	1,93	23,34	2,66	27,92
Extrato de soja preta 5-A	8,12	40,01	5,81	53,94
Extrato de soja preta 5-D	3,86	38,82	4,76	47,44

ND*: não detectado, valor menor que o limite de detecção do instrumento. BS**: base seca. [§] Extratos de soja obtidos a partir dos processos 4 e 5. A: antes da pasteurização. D: depois da pasteurização.

Nesta fase, também foi verificado a ocorrência de maior perda de antocianinas nas amostras submetidas ao tratamento térmico de pasteurização, confirmando a influência negativa da exposição à temperatura alta por tempo determinado na degradação das antocianinas.

Considerando os processos estudados na Fase II, o extrato de soja preta com maior teor de antocianinas foi obtido a partir de soja preta moída, não pasteurizado (extrato de soja preta 5-A, Tabela 2). O produto final obtido apresentou coloração característica da presença de antocinianas, bastante distinta do extrato de soja quando elaborado com soja amarela (Figura 9).

Figura 9. Extrato de soja preta com menor perda de antocianinas.

3.4 CONCLUSÕES

- ✓ Etapas de drenagem de líquidos após procedimentos de maceração ou cozimento de grãos de soja preta ocasionaram perda de antocianinas durante a obtenção de extrato de soja preta;
- ✓ O cozimento a 80°C por 10 min promoveu maior eficiência na extração de antocianinas da casca da soja preta;
- ✓ A utilização de grãos de soja preta previamente moídos como matéria-prima para a obtenção de extrato de soja preta favoreceu a extração das antocianinas, quando comparado à utilização do grão inteiro submetido ao mesmo processo de obtenção;
- ✓ Estudos futuros devem ser conduzidos para definir condições otimizadas de processamento, de modo a estabelecerem parâmetros mais adequados à produção do extrato de soja preta com menores perdas de antocianinas.
- ✓ Diferentes processos para garantir a segurança microbiológica de extrato de soja preta podem ser estudados com o intuito de conseguir resultados ainda melhores do que aqueles obtidos com a pasteurização.

3.5 REFERÊNCIAS

ABIR. Bebidas a Base de Soja 2010 a 2015. Disponível em: <http://abir.org.br/o-setor/dados/bebidas-a-base-de-soja//>. Acesso em: 15 mai 2017.

AL MAHFUZ, A. A.; TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; ONO, T. Changes of adstringente sensation of soy milk during tofu curd formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.52, n.23, p.7070-7074, 2004.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering, v.117, p. 426-436, 2013.

BENASSI, V. T.; YAMASHITA, F.; PRUDENCIO, S. H. A statistical approach to define some tofu processing conditions. Ciência e Tecnologias de Alimentos, v.31, n.4, p.897-904, 2011.

BONDRE, S.; PATIL, P.; KULKARNI, A.; PILLAI, M. M. Study on isolation and purification of anthocyanins and its application as pH indicator. International Journal os Advanced Biotechnology and Research, v.3, n.3, p.698-702, 2012.

DE MORAES FILHO, M. L., HIROZAWA, S. S., PRUDENCIO, S. H., IDA, E. I., GARCIA, S. *Petit Suisse* from black soybean: bioactive compounds and antioxidant properties during development process. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v.65, p.470-475, 2014.

FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S. C.; MODESTA, R. C. D. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.29, n.3, p.609-617, 2009.

FELLOWS, P.J. Tecnologia do processamento de alimentos. Woodhead Publishing Ltd. 2006. 602 p.

GOUVÊA, A. C. M. S.; MELO, A.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PEIXOTO, F. M.; FREITAS, V.; GODOY, R. L. O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from Neomitranthes obscura (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. Food Chemistry, v.185, p.277-283, 2015.

HA, T. J.; LEE, J. H.; SHIN, S-O.; SHIN, S-H.; HAN, S-I.; KIM, H-T.; KO, J-M.; LEE, M-H.; PARK, K-Y. Changes in anthocyanin and isoflavone concnetrations in black seed-coated soybean at different planting location. Journal of Crop Science and Biotechnoly. v.12, n.2, p. 78-86, 2009.

KANAMOTO, Y.; YAMASHITA, Y.; NANBA, F.; YOSHIDA, T.; TSUDA, T.; FUKUDA, I.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; ASHIDA, H. A black soybean seed coat extract prevents obesity and glucose intolerance by up-regulating upcoupling proteins and down-regulating inflammatory cytokines in high-fat diet-fed mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 8985-8993, 2011.

KIM, H. G.; KIM, G. W.; OH, H.; YOO, S. Y.; KIM, Y. O.; OH, M. S. Influence of roasting on the antioxidant activity of small black soybean (Glycine max L. Merrill). Food Science and Technology. v. 44, p. 992-998, 2011.

KOH, K.; YOUN, J. E.; KIM, H. S. Identification of anthocyanins in black soybean (Glycine max (L.) Merr.) varieties. Journal of Food Science and Technology, v.51, p.377-381, 2014.

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.

LIAO, H-F.; CHEN, Y-J.; YANG, Y-C. A novel polysaccharide of black soybean promotes myelopoiesis and reconstitutes bone marrow after 5-flurouracil- and irradiation-induced myelosuppression. Life Sciences, v.77, p.400-413, 2005.

LUTHRIA, D. L. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (Petroselinum crispum) flakes using a pressurized liquid extractor. Food Chemistry, v.107, p.745-752, 2008.

LV, Y-C.; SONG, H-L.; LI, X.; WU, L.; GUI, S-T. Influence of blanching and grinding process with hot water on beany and non-beany flavor in soymilk. Journal of Food Science, v.76, n.1, p. 520-525, 2011.

NELSON, A.I.; STEINBERG, M.P.; WEI, L.S. Illinois process for preparation of soymilk. Journal of Food Science, Chicago, Ill., v. 41, n. 1, p.57-61, 1976.

OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; LEITE, R. S.; CAMPOS FILHO, P. J. DE; VICENTINI, M. B. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/cultivares de soja (Glycine Max (L) Merril) especiais utilizados para alimentação humana. Brazilian Journal of Food Technology, v.13, n.1, p. 23-29, 2010.

PEREIRA, J. N.; GODOY, R. L. O.; FELBERG, I.; ESTEVES, T. C. F.; SANTIAGO, M. C. P. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Avaliação de metodologias de extração e caracterização do perfil de antocianinas em soja preta por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas

(MS). In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Aracajú-SE. Brasil, 2014.

POLISELI-SCOPEL, F. H., HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. LWT - Food Science and Technology. v. 46, p.42-48, 2012.

PRASAD, K. N.; HASSAN, F. A.; YANG, B.; KONG, K. W.; RAMANAN, R.N.; AZLAN, A.; ISMAIL, A. Response surface optimization for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilized Mangifera pajang Kosterm. peels. Food Chemistry, v.128, n.4, p.1121-1127, 2011.

QUEIROZ, F.; OLIVEIRA, C.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Degradation of anthocyanins and anthocyanidins in blueberry jams/stuffed fish. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.57, n.22, p.10712-10717, 2009.

RHO, S. J.; PARK, S.; AHN, C-W.; SHIN, J-K.; LEE, H.G. Dietetic and hypocholesterolaemic action of black soy peptide in dietary obese rats. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.87, n.5, p.908-913, 2007.

SANTIAGO, M. C. P. A.; GOUVÊA, A.C.M.S. ; GODOY, R. L. O. ; OIANO-NETO, J.; PACHECO, S. ; ROSA, J. S. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (Euterpe oleraceae Mart.). Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010 (Comunicado técnico, 162. Biblioteca: CTAA (FL CTE 0162 UMT)).

SARKIS, J. R.; JAESCHKE, D. P.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Effects of ohmic and conventional heating on anthocyanin degradation during the processing of blueberry pulp. LWT – Food Science and Technology, v.51, p.79-85, 2013.

SLAVIN, M.; KENWIRTHY, W.; YU, L. L. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of Maryland-grown soybeans with colored seed coats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 11174-11185, 2009.

TAKAHASHI, R.; OHMORI, R.; KIYOSE, 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.

TAN, Y.; CHANG, S. K. C.; ZHANG, Y. Innovative soaking and grinding methods and cooking affect the retention of isoflavones, antioxidant and

antiproliferative properties in soymilk prepared from black soybean. Journal of Food Science, v.81, p.1016-1023, 2016

TANTEERATARM, K.; NELSON, A.I.; WEI, L.S. Manufacturing of bland soymilk. In: WILLIAMS, S.W. Soybean processing for food uses. Urbana: INTSOY, 1999. p.154 -164.

WANG, D.; MA, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, X. Thermal characterization of the anthocyanins from black soybean (Glycine max L. Merrill) exposed to thermogravimetry. Food Science and Technology, v.55, p. 645-649, 2014.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Antioxidante capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybean in relation to their distribution of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 8365-8373, 2008a.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 7165-7175, 2008b.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y.; TANG, X. J.; DENG, Y. Y.; CHI, J. W. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (Glycine max L. Merr.) varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.59, p.5935-5944, 2011.

ZOU, Y.; CHANG, S. K. C. Effect of black soybean extract on the suppretion of the proliferation of human AGS gastric cancer cells via the induction of apoptosis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 4597-4605, 2011.

CAPITULO 4 ESTUDO DOS PARÂMETROS TEMPO E TEMPERATURA DE COZIMENTO E DOS TRATAMENTOS DE CONSERVAÇÃO NA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE SOJA PRETA COM MAIORES TEORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.1 INTRODUÇÃO

Como visto no Capítulo 3 desta tese, os teores de isoflavonas e antocianinas podem ser fortemente afetados pelo processamento (XU e CHANG, 2008b). Neste sentido, as metodologias de processamento comumente utilizadas para obtenção do extrato de soja amarela não são adequadas para a produção de extrato de soja preta. Diferentemente do extrato de soja amarela que pode ser obtido a partir de grãos descascados ou não, o extrato de soja preta deve ser elaborado utilizando grãos integrais para que as antocianinas presentes exclusivamente na casca sejam extraídas (XU e CHANG, 2008a).

A temperatura de processamento também apresenta relevante impacto sobre o conteúdo de antocianinas no extrato de soja preta. Baixas temperaturas de processamento não favoreceram a extração das antocianinas, enquanto altas temperaturas promoveram intensa degradação destes compostos (ESTEVES *et al*., 2017).

Além das etapas de obtenção do extrato, tratamentos térmicos como a pasteurização e o tratamento à ultra-altas temperaturas (UHT) são aplicados durante o processamento a (YUAN *et al*., 2008) com o objetivo de garantir a segurança alimentar do produto final. Novos métodos como a utilização de alta pressão (APH) também vêm sendo testados para assegurar a qualidade de bebidas de soja (POLISELI-SCOPEL *et al*., 2012; TORO-FUNES *et al*., 2014; 2015).

Considerando todas as alterações de processamento propostas neste trabalho, outro importante aspecto a ser considerado na elaboração desse novo produto é sua aceitação sensorial por parte do consumidor.

Desta forma, as condições de processamento de extrato de soja preta avaliando o binômio tempo-temperatura durante a etapa de cozimento e diferentes métodos de conservação visando à manutenção dos compostos bioativos no produto final foram estudadas. Além disso, a aceitação sensorial do produto obtido foi comparada à de bebidas comerciais de soja amarela disponíveis no mercado brasileiro.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Materia-Prima

A linhagem de soja preta (Glycine max (L.) Merrill) BRM09-50995 utilizada nesta etapa do estudo foi a mesma utilizada na fase II descrita no Capítulo 3 item 3.2.1 desenvolvida pelo Programa de Melhoramento de Soja para Alimentação Humana da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), colhida na região de Passo Fundo, RS, na safra 2013/2014.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Determinação da composição centesimal dos grãos de soja preta

A determinação de umidade, cinzas, extrato etéreo e proteínas (fator de conversão 6,25) dos grãos integrais, cotilédone, e da casca de soja preta foi realizada em triplicata segundo Métodos Oficiais da AOAC (2005). Os carboidratos foram calculados por diferença (100 g – gramas totais de umidade, proteína, lipídios e cinzas) (TACO, 2011).

4.2.2.2 Obtenção de extrato de soja preta (Delineamento experimental)

Para avaliar o efeito do tempo e da temperatura de cozimento sobre os teores de antocianinas, isoflavonas e estimativa de atividade antioxidante do extrato de soja preta foi realizado um delineamento experimental fatorial de 2^2 com três repetições no ponto central, utilizando o *software* STATISTICA™, versão 12.0 para Windows (StatSoft®), totalizando sete ensaios randomizados (Tabela 3).

Tabela 3. Fatores (temperatura e tempo de cozimento) para delineamento fatorial 2^2 do processamento de extrato de soja preta

Fatores	Ensaios (E)						
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Temperatura (°C)	80	80	98	98	89	89	89
Tempo (min)	5	15	5	15	10	10	10

Os intervalos de tempo (5 a 15 minutos) e temperatura (80 °C a 98 °C) de cozimento foram estabelecidos de acordo com estudos anteriores utilizando soja amarela (FELBERG *et al*., 2009) e soja preta (DE MORAES FILHO *et al*., 2014). Para o processamento dos extratos os grãos de soja preta foram selecionados, lavados com água corrente, secos em estufa a 70 °C por 5 minutos e moídos em moinho martelo (Perten Laboratory Mill 3100). O grão moído foi imerso em água à temperatura determinada para cada ensaio do planejamento na proporção de 1:10 (m/m) e mantida em banho sob temperatura controlada durante o tempo do ensaio. Após o cozimento, a mistura dos grãos e água de cozimento foi homogeneizada em Waring® *blender* por 2 min na velocidade baixa (Low) do equipamento e centrifugada para separação do extrato solúvel (IEC Model K7165; filtro de nylon 150 µm; V = 4000 rpm; t = 5 min) (Figura 10). As amostras de extrato de soja preta foram liofilizadas (Liobras K120) à temperatura de -97 ºC e vácuo de operação 20 µHg, sendo conservadas a -18°C para posterior análise do teor de isoflavonas, antocianinas e da atividade antioxidante.

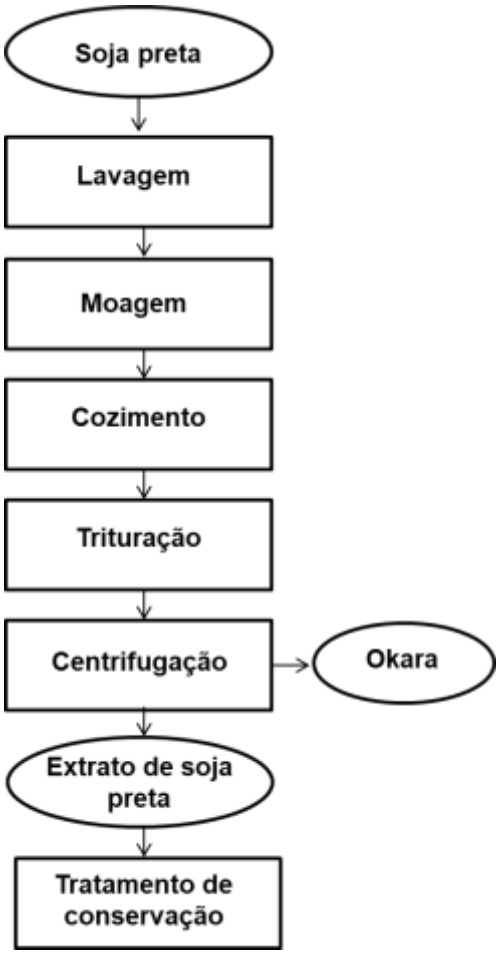


Figura 10. Diagrama de processamento para obtenção de extrato de soja preta.

4.2.2.3 Avaliação de diferentes tratamentos de conservação

O extrato de soja preta, resultado da melhor condição experimental obtida no delineamento fatorial (item 4.2.2.2), considerando menores perdas de compostos bioativos e maior atividade antioxidante, foi submetido a quatro diferentes tratamentos de conservação. Os tratamentos 1 (T1) e 2 (T2) foram realizados conforme Felberg et al. (2009) com modificações. Resumidamente, o extrato de soja preta recém-preparado foi submetido à temperatura de ebulição (95-98 °C) por 5 e 10 min, respectivamente. Para o tratamento 3 (T3) foi utilizado um trocador de calor (modelo FT25D Armfield, Reino Unido) operado a 132 °C durante 6 s, semelhante às condições utilizadas por Zhang et al. (2015). O tratamento 4 (T4) foi realizado utilizando ultra alta pressão (APH) a 200 MPa e temperatura de entrada de 45 °C (modelo nG7400H: 320

Stansted, Reino Unido), de acordo com o limite do equipamento. Os produtos resultantes desses quatro tratamentos foram comparados quanto ao seu conteúdo e perfil de antocianinas, teor de isoflavonas e atividade antioxidante.

4.2.2.4 Análise de antocianinas

O teor e perfil de antocianinas foram determinados nos grãos e nos extratos de soja preta. A extração de antocianinas dos grãos moídos e dos extratos de soja preta liofilizados foi realizada em duplicata, conforme metodologia descrita por Wang et al. (2014) com modificações. Para 1 g de cada amostra foi adicionado 20 mL de solução de extração (metanol/ água/ ácido clorídrico, 60: 39: 1) e a mistura mantida em banho de água (IKA HEIZBAD HB-250) a 50 °C durante 1 h, seguida por centrifugação (SORVALL LEGEND Centrífuga XRT) a 12.000 RPM durante 10 min a 25 °C. O sobrenadante de cada extração foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o centrifugado foi submetido à nova extração, nas mesmas condições, porém por apenas 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para o balão já com o conteúdo da 1ª. extração e o volume completado até 50 mL (balão volumétrico) com a solução de extração (Figura 11). As soluções metanólicas obtidas foram filtradas em membrana de PTFE (politetrafluoretileno) com tamanho de poro de 0,45 µm, armazenadas em frasco âmbar a -18 °C. A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um cromatógrafo Waters® Alliance 2695, com detector de arranjo de fotodiodos Waters® 2996, utilizando coluna Thermo® BDS HYPERSIL C_{18} (100 × 4,6mm; 2,4µm) mantida a 40 ° C, e gradiente ácido fórmico 5% e acetonitrila como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, de acordo com Gouvêa *et al*. (2015).

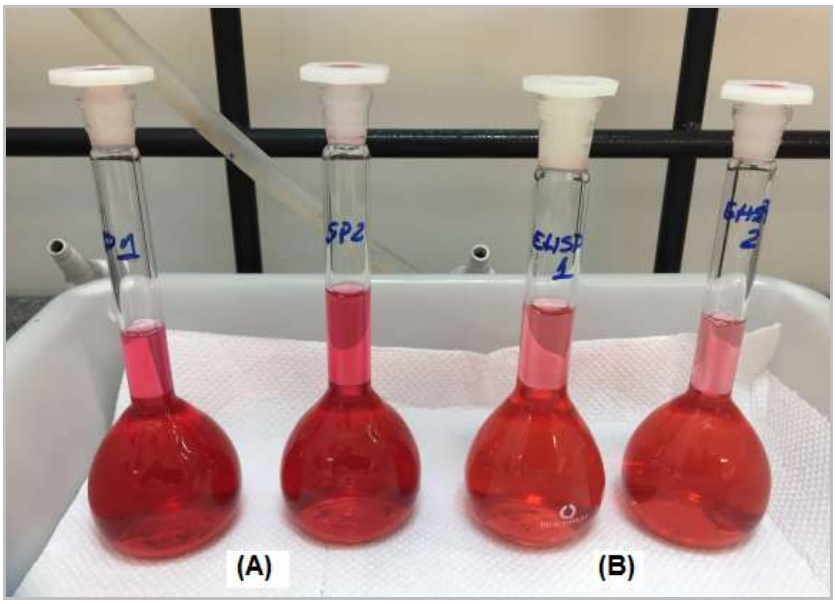


Figura 11. Soluções metanólicas de antocianinas de grãos de soja preta (A) e extrato de soja preta (B).

A obtenção e o processamento dos dados foram realizados utilizando o software Empower® (Waters). Os espectros UV-Vis foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados a 520 nm. As antocianinas foram identificadas considerando o comportamento cromatográfico e os dados dos espectros UV-Vis comparados a padrões analisados nas mesmas condições. A identificação de cada antocianina foi confirmada por dados de massa molecular, obtidos por espectrometria de massas utilizando um espectrômetro Synapt G1 (Waters) equipado com fonte de ionização por electrospray e analisador de massa quadrupolo-tempo de vôo (Q-TOF). A quantificação foi realizada por calibração externa utilizando padrões de delfinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo com purezas superiores a 99% e confirmado por espectrômetro de massa de Synapt Waters ESI- Q-TOF (Gouvêa *et al*., 2015).

4.2.2.5 Análise de isoflavonas

A extração e análise de isoflavonas (genistina, genisteína, daidzina, daidzeína, glicitina e gliciteína) nos grãos e extratos de soja preta foram realizadas em duplicata de acordo com AOAC (2005), método 2001.10. A

análise foi conduzida utilizando um cromatógrafo Waters® Alliance 2695 (Waters, Waltham, MA, EUA) equipado com um detector de arranjos de fotodiodos (PDA, Waters 2996). As isoflavonas foram separadas em uma coluna YMC C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm), mantida a 45 ° C, utilizando um gradiente de água/metanol com 2% de ácido acético como fase móvel (1,3 mL/min) . A obtenção e o processamento de dados foram realizados utilizando o software Empower® (Waters). Os espectros UV-Vis foram obtidos entre 200 e 400 nm e os cromatogramas processados a 260 nm.

A identificação de isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e glicitina) e glicosídicas (genistina, daidzeína e glicitina) foi realizada considerando o comportamento cromatográfico e os espectros UV-Vis comparados ao padrão analisado nas mesmas condições. A quantificação das isoflavonas foi realizada pela curva de calibração externa construída a partir de soluções de padrões (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) de todas as isoflavonas avaliadas. As concentrações dessas soluções foram determinadas por espectrofotometria, em equipamento Shimadzu modelo UV 1800, considerando o coeficiente de extinção molar individual de cada isoflavona, segundo Murphy et al. (2002). Os resultados das isoflavonas totais foram expressos como equivalentes em agliconas por soma do teor de isoflavonas agliconas (genisteína, gliciteina e daidzeína) e seus respectivos glicosídeos convertidos em agliconas pelo uso de fatores de conversão (Tabela 4), tal como descrito na AOAC (2005).

Tabela 4. Isoflavonas e fator de conversão aglicona/glicosídeo correspondente

Isoflavona	Massa Molecular (g/mol)	Fator de conversão aglicona/glicosídeo
Genisteína	270	-
Genistina	432	0,625
Daidzeína	254	-
Daidzina	416	0,611
Gliciteína	284	-
Glicitina	447	0,637

4.2.2.6 Estimativa da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante das soluções metanólicas de antocianinas obtidas para a análise de antocianinas dos grãos e extratos de soja preta (item 4.2.2.4) foi estimada por meio do ensaio de DPPH. O ensaio de DPPH baseia-se na redução do radical estável 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) em solução metanólica pela amostra ou composto antioxidante, de acordo com o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

Para a análise, uma alíquota (0,1 mL) de diferentes diluições da amostra foi misturada a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH e a desativação do radical livre foi monitorada por meio de leitura da absorbância a 515 nm após 15 minutos de reação. Os percentuais de DPPH remanescente foram calculados utilizando os valores de absorbância obtidos com cada diluição das amostras, sendo esses resultados utilizados para obtenção de curvas de porcentagem de DPPH remanescente em função da concentração de antocianinas totais.

A atividade antioxidante foi expressa como a quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (EC50) e o Trolox e a quercetina foram utilizados como antioxidantes de referência. Avaliação da possível contribuição gerada pela cor das antocianinas presentes nas amostras para a absorbância em 515 nm foi realizada na diluição utilizada para o ensaio (0,1 mL de amostra para 3,9 mL de metanol). Foi verificado que não houve contribuição na leitura e, portanto, a cor das antocianinas nas amostras não foi um interferente na estimativa da atividade antioxidante.

4.2.2.7 Estimativa da atividade antioxidante pelo método ORAC

O ensaio de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) foi conduzido de acordo com Huang *et al*. (2002) para análise de atividade antioxidante nos grãos e extratos de soja preta. Resumidamente, 25 µL de diferentes diluições das amostras (soluções metanólicas obtidos conforme item 2.2.4) e do padrão foram dispostos em uma placa com 96 poços (Figura 12) e adicionados 150 uL de fluoresceína (concentração final de 61,2 nM) a 37 °C com tempo de reação de 30 min. Em seguida, foram adicionados 25 µL de 2,2

azobis amidinopropano (AAPH) (19,1 mM de concentração final) em cada poço da placa e a fluorescência a 528 nm foi monitorizada durante 60 min a 37 °C. As amostras e o padrão foram diluídos com solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) para o intervalo de concentração adequado com o objetivo de ajustar o intervalo de linearidade da curva padrão. Utilizou-se o AAPH como gerador de radical peroxil e a quercetina como padrão devido à sua maior semelhança química com as antocianinas quando comparada ao Trolox, composto comumente usado como antioxidante de referência neste método (HUANG *et al*., 2002). Ambas as soluções de AAPH e quercetina foram preparadas com tampão fosfato salino (pH 7,4), que foi utilizado como branco. Os resultados foram expressos em quercetina equivalente (QE) por grama de amostra.

Figura 12. Preparação de placa para análise de atividade antioxidante pelo método ORAC.

4.2.2.8 Avaliação estatística dos dados

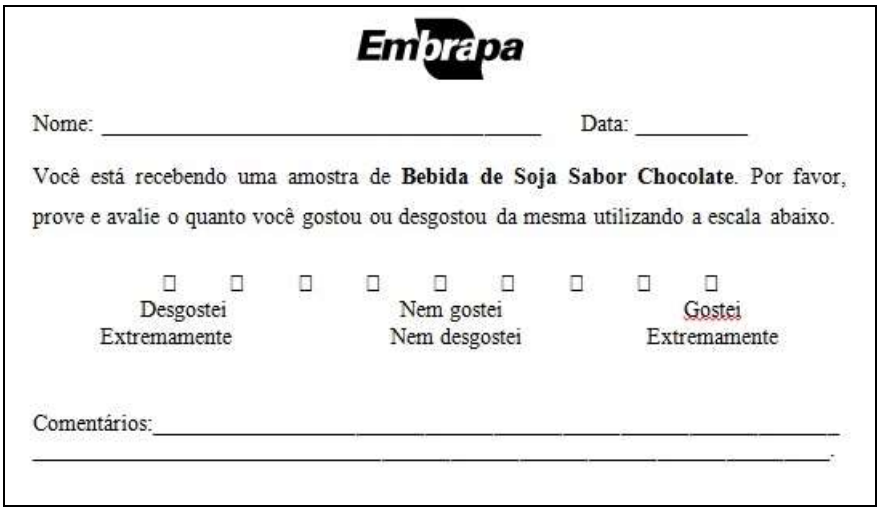
O software STATISTICA ™, versão 12.0 para Windows (Tulsa, EUA), foi utilizado para o desenho experimental e análise estatística. Análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher (LSD) foram utilizados para verificar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o perfil e teor de antocianinas, os teores de isoflavonas e os ensaio de atividade antioxidante.

4.2.2.9 Teste de aceitação de bebida de soja preta formulada sabor chocolate

A aceitabilidade sensorial do extrato de soja preta obtido a partir da melhor condição de processamento estudada neste trabalho foi avaliada em teste de aceitação de consumidor em relação a duas bebidas comerciais de extrato de soja amarela sabor chocolate: a bebida líder no mercado brasileiro e uma bebida orgânica.

Para esse teste, o produto foi formulado com um alimento achocolatado em pó que continha em sua formulação: açúcar, cacau em pó, extrato de malte, sal, soro em pó, leite em pó desnatado, vitaminas, aromatizantes e lecitina de soja. A escolha do achocolatado utilizado na formulação do extrato de soja preta foi resultado de uma avaliação prévia entre três marcas comerciais, realizada em discussão aberta com 8 funcionários da Embrapa Agroindústria de Alimentos que fazem parte da equipe de provadores treinados para avaliação de bebidas de soja.

O teste de aceitação das bebidas de soja sabor chocolate foi realizado por 100 consumidores (60 do sexo feminino e 40 do sexo masculino) com idades entre 18 e 68 anos, recrutados entre funcionários e alunos, no Laboratório de Sensorial da Embrapa Agroindústria de Alimentos, usando escalas hedônicas estruturadas de 9 pontos onde 1: desgostei extremamente e 9: gostei extremamente (Meilgaard *et al*., 1991), conforme Figura 13.



Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de **Bebida de Soja Sabor Chocolate**. Por favor, prove e avalie o quanto você gostou ou desgostou da mesma utilizando a escala abaixo.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Desgostei Extremamente				Nem gostei Nem desgostei				Gostei Extremamente

Comentários:_____
_____.

Figura 13. Ficha de avaliação para teste de aceitação de bebida de soja preta formulada sabor chocolate e duas bebidas de soja amarela sabor chocolate comerciais.

As bebidas foram apresentadas em ordem sequencial monádica a 8 ± 2 °C em copos de plástico de 50 mL codificados com números de três dígitos. A ordem da apresentação da amostra foi equilibrada para evitar efeitos de transição (MACFIE *et al*., 1989). Água potável foi fornecida para enxaguar a boca entre as amostras. Os provadores preencheram um questionário para fornecer informações gerais sobre sua idade, gênero e frequência de consumo de produtos de soja.

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher (LSD) para identificar diferenças significativas entre médias ($p \leq 0,05$). A análise hierárquica de *cluster* foi utilizada para identificar consumidores com diferentes classificações de aceitação para as bebidas de soja. Foram consideradas as distâncias euclidianas e o critério de agregação de Ward.

O delineamento experimental do estudo sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) (CAAE: 55617516.2.0000.5282).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização do grão de soja preta

4.3.1.1 Determinação da composição centesimal

A soja é reconhecida como uma excelente fonte de proteína de alta qualidade e de óleo. Está bem documentado que a soja contém em média cerca de 40% de proteína, 23% de carboidratos, 20% de lipídios, 5% de minerais, 4% de fibra e 8% de umidade (GOPALAN, RAMA SASTRI e BALASUBRAMANIAN, 1989; LIU, 2004), e que as alterações na sua composição são função da cultivar, estádio de maturação, fatores ambientais e armazenamento (LEE e CHO, 2012; SANTANA *et al*., 2012).

A composição centesimal do grão integral (BRM 09-50995) e de suas partes (cotilédone e casca) (Tabela 5) se apresentou em conformidade com os valores encontrados na literatura.

Tabela 5. Composição centesimal da soja BRM 09-50995: grão integral, cotilédone e casca

Amostras	Umidade (g/100g)	Média ± DP**(g/100g), em base seca			
		Minerais	Proteínas	Lipídios	Carboidratos*
Grão integral	8,00 ± 0,24	5,70 ± 0,03	42,16 ± 0,84	19,89 ± 0,13	33,38 ± 0,90
Cotilédone	9,18 ± 0,25	5,87 ± 0,13	43,65 ± 0,40	21,86 ± 0,02	28,46 ± 0,27
Casca	8,50 ± 0,37	4,33 ± 0,05	9,21 ± 0,00	0,81± 0,00	86,24 ± 0,46

*Calculados por diferença.**DP = desvio padrão.

Lee e Cho (2012) estudaram cinco cultivares de soja preta na Coréia e encontraram valores de proteínas variando de 44,3 a 40,8% e de lipídios entre 18,5 e 21,6% da composição dos grãos nas análises realizadas no ano de colheita. Também Shi, Yang e Kuo (2002) avaliaram a composição química de duas cultivares de soja preta e encontraram, aproximadamente, 11% de umidade, 21% de lipídios e 5% de minerais para as duas cultivares, que diferiram no conteúdo de proteínas apresentando uma 40,6% enquanto a outra 45,7%. Um trabalho realizado com quatro linhagens de soja preta da Embrapa,

incluindo a BRM 09-50995 utilizada neste estudo, não encontrou grandes variações em termos de macronutrientes, sendo a composição geral dos grãos constituída de 11% de umidade, 41% de proteínas, 19% de lipídios, 34% de carboidratos e 5% de minerais (PEREIRA, 2015).

A composição centesimal da casca da BRM 09-50995 também se mostrou de acordo com dados da literatura. Mullin e Xu (2001) estudaram as características da casca de seis cultivares de soja e encontraram valores de proteínas de 9-12 g/100g, e de minerais de 4-5 g/100g. Conforme esperado, os autores verificaram que os carboidratos não digeríveis foram os principais componentes da casca, com destaque para a celulose, hemicelulose, pectina e lignina.

4.3.1.2 Análise de antocianinas

A solução metanólica obtida para a análise de antocianinas e para estimativa da atividade antioxidante dos grãos de soja preta apresentou coloração rosa, característica da presença de antocianinas (Tabela 15).

Figura 14. Solução metanólica de antocianinas de soja preta.

Três antocianinas foram detectadas e identificadas nos grãos de soja preta, conforme ilustrado no cromatograma obtido por HPLC-PDA (Figura 15). Os picos 1, 2 e 3 foram identificados, respectivamente, como delfinidina-3-glicosídeo, cianidinha-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo, com base no

comportamento cromatográfico e nos dados de absorção no UV-Vis, comparado a padrões analisados nas mesmas condições das amostras, bem como nos dados obtidos por espectrometria de massas (conforme descrito no item 4.2.2.4). A Figura 16 ilustra os espectros de massas obtidos para as antocianinas identificadas em soja preta neste trabalho.

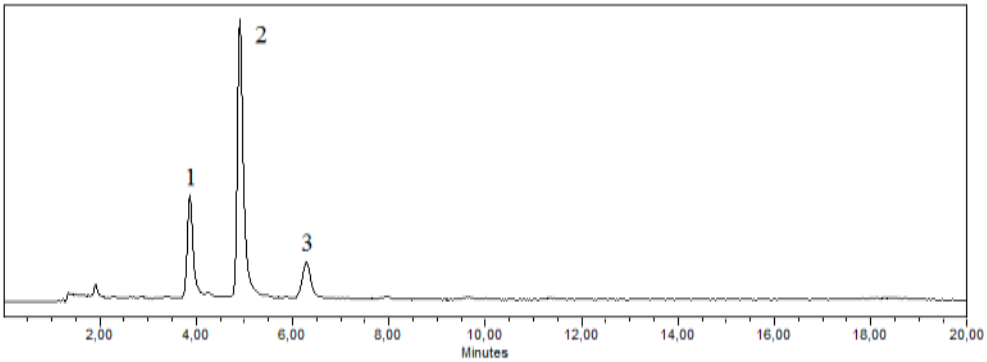


Figura 15. Cromatograma obtido por FPLC-PDA, processado a 520 nm, de extrato metanólico de antocianinas de grãos de soja preta (Pico 1: delfinidina-3-glicosídeo; Pico 2: cianidina-3-glicosídeo; Pico 3: petunidina-3-glicosídeo).

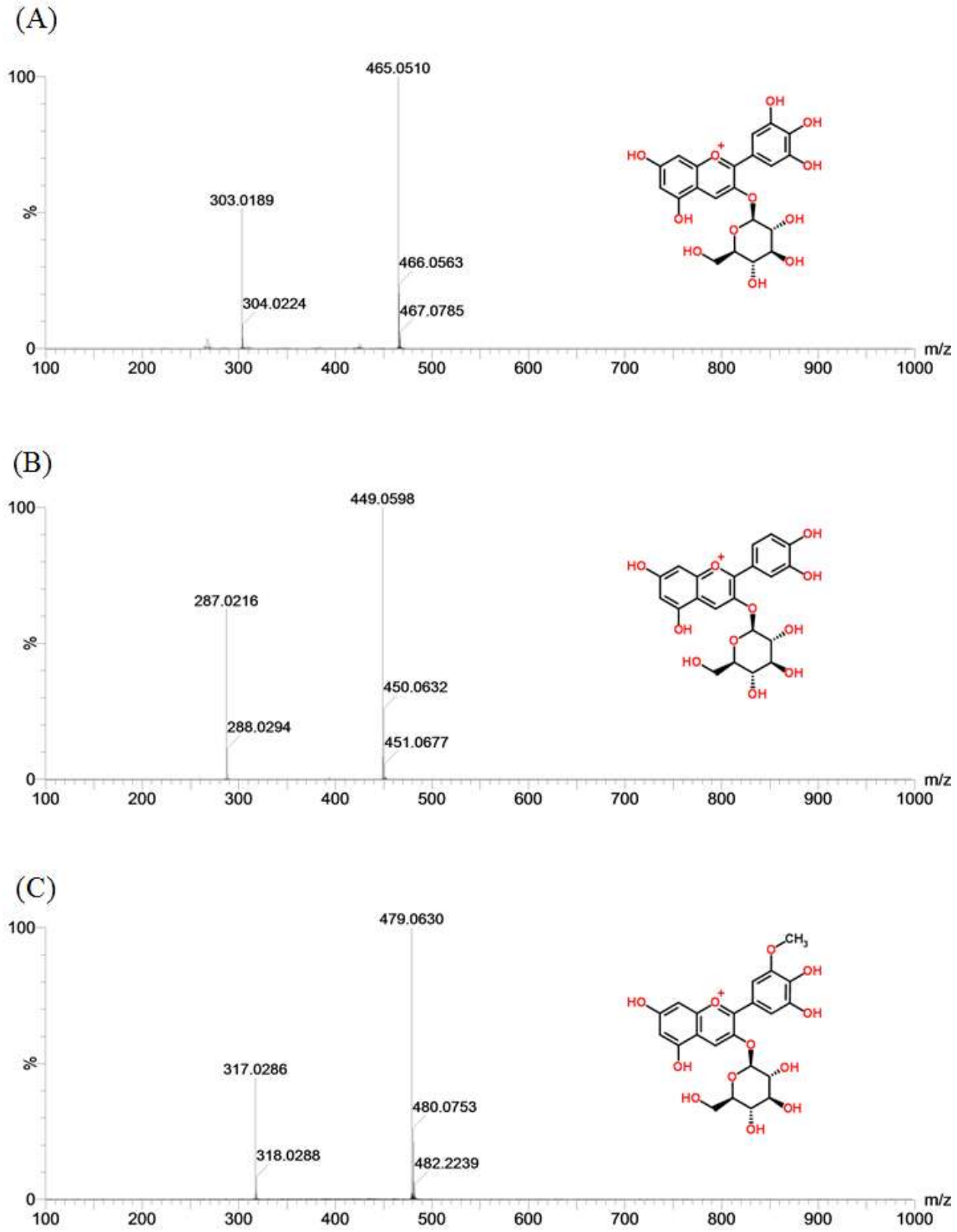


Figura 16. Espectros de massas e estruturas químicas das antocianinas encontradas nos grãos da soja preta avaliada: (A): Delfinidina-3-glicosídio; (B) Cianidina-3-glicosídeo; (C) Petunidina-3-glicosídeo.

As mesmas três antocianinas também foram as antocianinas principais encontradas por Lee *et al*. (2009) na cultivar Cheongja 3, contudo os autores identificaram ainda outras seis antocianinas minoritárias: catequina-cianidina-3-glicosídeo, delfinidina-3-galactosídeo, cianidinha-3-galactosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e cianidina. Em estudo mais recente com cinco cultivares de soja preta (Milyang 147, Cheongja, Milyang 149, Geomjeong 3 e Ilpumgeomjeong), Lee e Cho (2012) detectaram apenas as antocianinas principais atribuindo esse fato a diversos fatores como a luminosidade, temperatura, genética, cultivar e estresse ambiental.

Koh, Youn e Kim (2014) avaliaram duas cultivares de soja preta (Tawonkong e Geomjeongkong-2) e encontraram as mesmas antocianinas principais encontradas neste estudo e mais três antocianinas minoritárias: pelargonidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-(6”-malonilglicosídeo) e cianidina.

E ainda em estudo com 60 cultivares chinesas de soja preta, seis antocianinas foram identificadas. Cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo) foram encontradas em todas as cultivares, enquanto delfinidina-3-glicosídeo e cianidina-3-galactosídeo foram identificadas em 56 e malvidina-3-glicosídeo somente em 48 cultivares dentre as sojas pretas avaliadas (ZHANG *et al*., 2011). Nos trabalhos encontrados na literatura, a cianidina-3-glicosídeo foi a antocianina majoritária em todas as cultivares de soja preta avaliadas.

O conteúdo total de antocianinas encontrado no grão de soja preta utilizado neste estudo foi de 92,15 mg/100g, sendo 32,80 mg/100 g de delfinidina-3-glicosídeo, 46,90mg/100 g de cianidina-3-glicosídeo e 12,45 mg/100 g de petunidina-3-glicosídeo. Estes valores estão em concordância com Lee *et al*. (2016) que avaliaram o conteúdo de antocianinas em 56 cultivares de soja preta provenientes da Coreia e encontraram valores de 19,8 a 1420,4 mg/100g de grão e mesmo perfil encontrado neste estudo para todas as cultivares analisadas.

Diferenças nos teores de antocianinas nos grãos podem ser observadas em função da cultivar, safra, condições ambientais e de armazenamento (KIM et al., 2014). De Moraes *et al*. (2014) encontraram 60,4 mg de antocianinas por

100 g de grão de soja preta, enquanto Xu e Chang (2008a) quantificaram apenas 8,6 mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de soja preta.

As antocianinas da soja preta estão presentes exclusivamente na casca do grão (WANG *et al*., 2014; KIM *et al*., 2015) a qual corresponde a, aproximadamente, 8% do peso da soja (LIU, 1999). Para possibilitar a discussão dos resultados aqui apresentados no grão integral com trabalhos em que o teor de antocianinas foi determinado a partir da casca isoladamente, foi calculada a quantidade aproximada de antocianinas presentes na casca (Equação 1) e obtido o valor de 1.151,87 mg de antocianinas por 100 g de casca de soja preta.

$$\frac{92{,}15}{x} = \frac{100}{8} \therefore x = 1.151{,}87\ mg\ de\ antocianinas\ por\ 100g\ de\ casca \qquad \text{Equação 1}$$

Esse valor está de acordo com o teor de antocianinas na casca encontrado por Pereira (2015) para a mesma linhagem BRM09-50995 (1.190,5 mg/100g) em estudo para caracterização de quatro grãos de soja preta desenvolvidas pela Embrapa. As outras três linhagens apresentaram concentrações de antocianinas na casca de 847,3 mg/100g (BRM09-50901), 750,2 mg/100g (BRM11-51400) e de 398,2 mg/100g (BRM-09-50682).

Jeng *et al*. (2010) avaliaram o conteúdo e perfil de antocianinas presentes na casca de três cultivares de soja preta. As três cultivares apresentaram o mesmo perfil da soja utilizada no presente estudo composto por delfinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo e os valores de antocianinas totais na casca para as cultivares CRWD, Tainan3 e Tainan 5 foram 1.881 mg/100g, 2.025 mg/100g e 723 mg/100g, respectivamente.

Xu e Chang (2008a) identificaram três antocianinas na casca (cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo) com um conteúdo total de 95,1 mg de antocianinas por 100 g de casca. Zhang *et al*. (2011) avaliaram o conteúdo de antocianinas da casca de 60 cultivares e encontraram grande variação de valores desde 98,8 mg até 2.132,5 mg de antocianinas por 100 g de casca.

4.3.1.3 Análise de isoflavonas

Quatro isoflavonas foram identificadas nos grãos de soja preta: daidzina, glicitina, genistina e daidzeína, conforme mostrado no cromatograma da Figura 17.

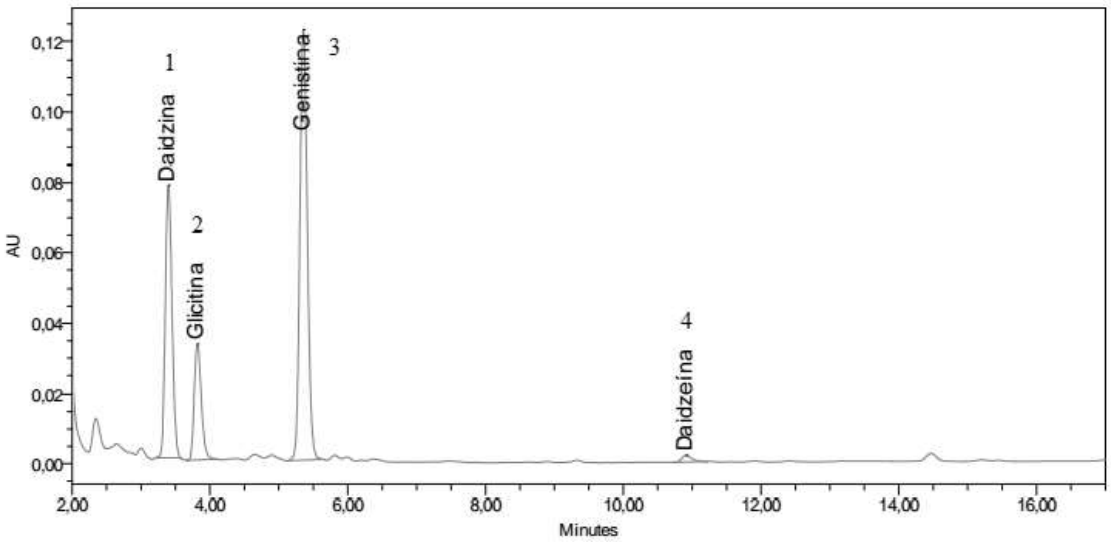


Figura 17. Cromatograma obtido por HPLC-PDA, processado a 260 nm, do extrato de isoflavonas do grão de soja preta (Pico 1: glicitina; Pico 2: daidzina; Pico 3: genistina e Pico 4: daidzeína).

Os teores totais de isoflavonas encontrados no grão de soja preta estão apresentados na Tabela 6. Estes resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura. Kumar *et al*. (2010) avaliaram seis cultivares de soja preta e encontraram valores de isoflavonas entre 46,5 mg/100 g e 147,9 mg/100g. Também Jeng *et al*. (2010) identificaram daidizina, genistina e glicitina nas três cultivares de soja preta que avaliaram, com valores de isoflavonas totais variando de 63,0 à 177,0 mg/100 g. Enquanto Lee et al. (2016) identificaram daidizina (12,3 – 153,5 mg/100g), glicitina (2,4 – 35,5 mg/100g), genistina (20,8 – 146,6 mg/100g), daidzeína (0,3 – 9,2 mg/100g), gliciteína (0,7 – 14,9 mg/100g) e genisteína (0,2 – 3,1 mg/100g) em estudo com 56 cultivares de soja preta, com valores de isoflavonas totais que variaram de 43,8 a 347,5 mg/100g de grãos.

Tabela 6. Teores de isoflavonas no grão de soja preta da cultivas BRM 09-50995

Isoflavonas	**Médias ± DP**** **(mg/100g, base seca)**
Daidzina*	32,28 ± 2,52
Glicitina*	15,43 ± 0,01
Genistina*	54,82 ± 1,56
Daidzeína	1,40 ± 0,06
Gliciteína	ND***
Genisteína	ND***
Totais	**116,93 ± 4,65**

*Equivalente em agliconas (AOAC, 2005).
**DP = desvio padrão. ***ND = não detectado

Kim *et al*. (2014) analisaram as isoflavonas de uma cultivar de soja preta e uma de soja amarela plantadas e colhidas em três diferentes localizações e observaram que a cultivar e a localização apresentaram efeitos significativos sobre o conteúdo de isoflavonas. Os autores observaram que o conteúdo de três isoflavonas majoritárias foi 1,1-3,1 vezes maior na cultivar de soja preta em relação à cultivar amarela e que o teor de isoflavonas apresentou uma correlação positiva com a presença de baixas temperaturas durante o desenvolvimento da semente.

Cho *et al*. (2013) avaliaram treze cultivares de soja de origem coreana com diferentes cores de casca (quatro amarelas, quatro pretas, duas marrons e três verdes), nas safras de 2009 e 2010. O conteúdo de isoflavonas nas sojas amarelas variou de 155,4 a 378,6 mg/100 g em 2009 e de 149,8 a 446,17 mg/100 g em 2010. Para as sojas pretas o teor de isoflavonas variou de 72,3 a 390,4 mg/100 g na safra 2009 e de 102,4 a 342,9 mg/100 g na safra 2010. As duas sojas marrons tiveram valores de 87,1 e 235,2 mg/100 g em 2009 e de 170,6 e 235,9 mg/100 g em 2010. Enquanto as sojas com casca verde tiveram teores de isoflavonas de 219,0 a 403,5 mg/100 g na safra 2009 e de 244,1 a 478,6 mg/100 g na safra 2010. A diferença de valores entre safras para uma mesma cultivar chegou a 50%.

Portanto, os teores de isoflavonas encontrados no presente trabalho e nos diversos estudos aqui referenciados mostraram estar nas mesmas faixas de valores de isoflavonas determinadas para os grãos com casca amarela que, de acordo com relatório do USDA (2008) variaram de 10,0 a 440,7 mg/100g (USDA, 2008). Além disso, da mesma forma que para os grãos de soja amarela, os teores de isoflavonas glicosídicas em soja preta são superiores aos de agliconas (CARRÃO-PANIZZI, SIMÃO, KIKUCHI, 2003; MATHIAS et al., 2006).

Os dados da literatura mostram e os obtidos neste trabalho corroboram que o perfil e conteúdo de isoflavonas não são determinados pela cor da casca, mas sim pelas características da cultivar e pelas condições ambientais às quais o grão é submetido (GÓES-FAVONI *et al*., 2010; MURPHY *et al*., 2012).

4.3.1.4 Estimativa da atividade antioxidante pelo método DPPH

O método DPPH tem sido amplamente utilizado na avaliação de compostos antioxidantes, como carotenoides, compostos fenólicos e antocianinas de vegetais, frutas e plantas naturais (LEE e CHO, 2012).

Nesse método, o radical estável DPPH•, de coloração púrpura, é reduzido por ação de um antioxidante formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, e esta reação é monitorada pelo decréscimo da absorbância a 515 nm, que é diretamente proporcional à concentração do radical DPPH no meio (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER E BERSET, 1995). Com os dados de absorbância pode-se então calcular a porcentagem de radical desativado para uma dada concentração de antioxidante presente no meio de reação. A partir dos resultados de porcentagem de desativação do radical para diferentes concentrações de um mesmo antioxidante é possível obter uma curva que permite estimar o valor de EC50. O EC50 é definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH• e, portanto, quanto menor o valor de EC50, maior a atividade antioxidante do composto em avaliação.

A Figura 18 ilustra a curva de concentração de DPPH• remanescente em função da quantidade de extrato metanólico do grão de soja preta presente no

meio. O valor de EC50 obtido para esse extrato foi de 0,76 mg/L, enquanto para os antioxidantes usados como referência o EC50 foi de 4,97 mg/L para o Trolox e 2,51 mg/L para a quercetina.

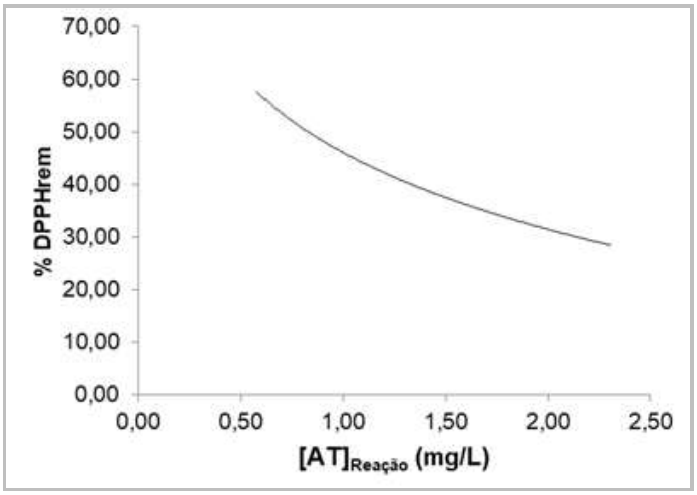


Figura 18. Curva da % de DPPH• remanescente em função da concentração de antioxidante.

Zhang *et al*. (2011) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos metanólicos de cascas de 60 cultivares de soja preta e encontraram valores de EC50 que variaram de 0,048 mg/L a 0,65 mg/L.

Uma das grandes dificuldades na comparação de estudos de atividade antioxidante pelo método DPPH é o fato de os resultados serem expressos de diferentes formas.

Pereira (2015) avaliou a capacidade antioxidante da casca de quatro linhagens de soja preta desenvolvidas pela Embrapa e verificou que a BRM09-50995, mesma linhagem utilizada neste estudo, foi a que apresentou maior atividade em comparação às demais (Figura 19).

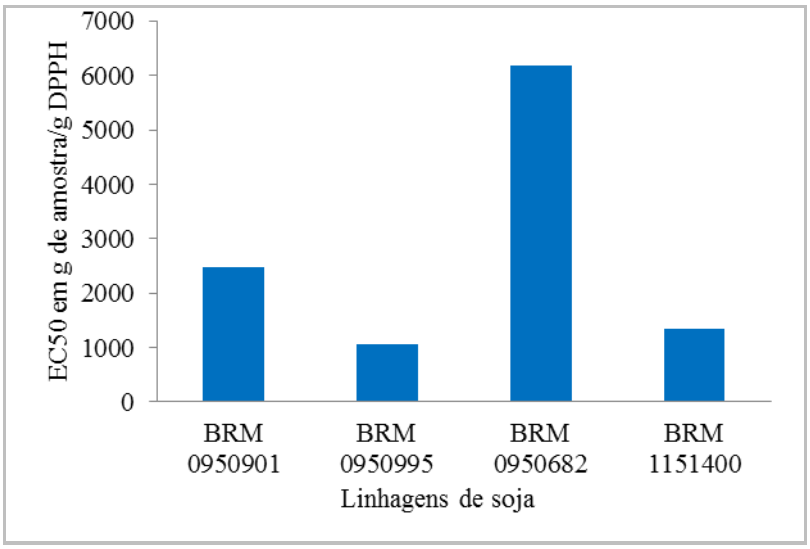


Figura 19. Atividade antioxidante da casca de quatro linhagens de soja preta desenvolvidas pela Embrapa determinada pelo método DPPH em trabalho realizado por Pereira (2015).

Jeng *et al*. (2010) avaliaram a atividade antioxidante em casca, hipocótilo e cotilédone de três cultivares de soja preta, sendo a atividade de desativação do radical DPPH• expressa em equivalentes de Trolox por unidade de peso seco. Os autores encontraram que as maiores atividades antioxidantes detectadas nas sojas pretas estudadas foram encontradas nas cascas (78,9 a 161,9 mg de trolox equivalente por g em base seca), seguido pelos encontrados em hipocótilo (9,89 a 9,96 mg de trolox equivalente por g em base seca), enquanto os cotilédones apresentaram apenas traços de atividade (0,70 a 0,94 mg de trolox equivalente por g em base seca). Os valores do ensaio de DPPH para os grãos integrais variaram de 7,05 a 15,98 mg de trolox equivalente por g em base seca.

Lee e Cho (2012) avaliaram a atividade antioxidante de cinco cultivares de soja preta pelo método DPPH e determinaram o percentual de atividade de desativação do radical DPPH• por meio da seguinte fórmula: Atividade de desativação do radical DPPH• (%) = (1 – absorbância da amostra/absorbância do controle) × 100. O maior valor de atividade encontrada entre as cinco cultivares foi de 93% e o menor 64%, enquanto os antioxidantes de referência utilizados BHT e Trolox apresentaram 71% e 79%, respectivamente, de atividade de desativação do radical DPPH•.

Kumar *et al*. (2010) também apresentaram desta mesma forma os resultados de atividade antioxidante obtidos para seis cultivares de soja amarela, seis cultivares de soja verde e seis cultivares de soja preta. Os valores para a atividade de desativação do radical DPPH• variaram de 16,42 a 44,05% para a soja amarela, de 21,08 a 32,55% para a soja verde e de 59,71 a 83,47 para a soja preta. De fato, em geral, a atividade antioxidante estimada para a soja preta é maior do que para as demais cultivares que não possuem a casca preta (TAKAHASHI *et al*., 2005; MALENCIC, CVEJIC e MILADINOVIC, 2012).

4.3.1.5 Estimativa da atividade antioxidante pelo método ORAC

O ORAC é um método muito utilizado para avaliação de atividade antioxidante pela inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio (SLAVIN *et al*., 2009; ALVES *et al*., 2010).

Neste trabalho, pela primeira vez na literatura sobre soja preta, a quercetina foi utilizada como antioxidante de referência devido à sua semelhança estrutural com as antocianinas. Tanto a quercetina como as antocianinas são flavonoides e apresentam a mesma estrutura básica derivada da benzo-y-pirona, enquanto o Trolox, padrão de referência mais utilizado para atividades antioxidantes relativas, é um análogo sintético da vitamina E, solúvel em água, com uma estrutura química bastante diferente dos flavonoides (Figura 20) (HAVSTEEN, 2002; LÚCIO *et al*., 2009).

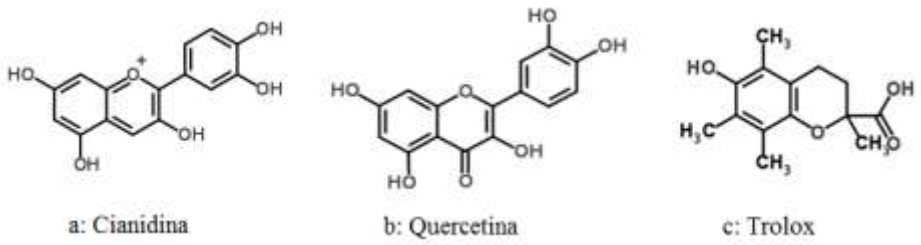


Figura 20. Estruturas químicas de a: cianidina, b: quercetina, c: trolox. URL. (http://www.chemspider.com).

A atividade antioxidante obtida para o grão de soja pelo método ORAC foi de 20,33 µmol QE (quercetina equivalente) por grama de soja preta. Contudo, para possibilitar a comparação dos resultados deste trabalho com os dados da literatura, foi calculado um fator de conversão a partir da razão entre o valor ORAC da quercetina e o valor ORAC do Trolox, determinados em ensaios preliminares, sendo, portanto, QE = 6,7 ± 0,8 TE (Trolox equivalente). Esse resultado está de acordo com o relatado por Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan e Prior (2002), que compararam a capacidade antioxidante de vários produtos químicos puros por valores ORAC expressos como TE, estimando em 7,1 ± 0,2 TE a capacidade antioxidante da quercetina.

Utilizando o fator de conversão calculado, a atividade antioxidante para o grão de soja foi estimada em 136,21 µmol TE/g e está de acordo com dados reportados pela literatura apresentados em seguida.

Slavin *et al*. (2009) avaliaram a atividade antioxidante de dezoito cultivares de soja de diferentes cores sendo cinco pretas, quatro marrons, duas verdes e sete amarelas. As de coloração preta apresentaram atividade antioxidante superior às demais, variando o valor de ORAC de 75 a 255 µmol TE/g, enquanto para as sojas das demais colorações o maior valor de ORAC obtido foi de 75 µmol TE/g.

Xu e Chang (2008a) também verificaram maiores valores de ORAC para a soja preta em relação à soja amarela. Para a soja preta, os valores de ORAC foram muito superiores na casca (aproximadamente, 450 µmol TE/g) em relação ao grão integral (aproximadamente, 125 µmol TE/g) e ao grão descascado (aproximadamente, 50 µmol TE/g). O grão integral apresentou valor de ORAC significativamente ($p < 0,05$) maior que o grão descascado que, por sua vez, não apresentou diferença significativa em relação ao grão de soja amarela (aproximadamente, 55 µmol TE/g).

A atividade antioxidante da casca de 60 cultivares de soja preta foi avaliada por Zhang *et al*. (2011) pelo método ORAC. Os valores variaram de 212,5 a 1340,6 µmol TE/g, sendo que cinquenta e uma das sessenta amostras estudadas pelos autores apresentaram valores superiores a 450 µmol TE/g, encontrados por Xu e Chang (2008).

4.3.2 Obtenção de extrato de soja preta (Planejamento experimental)

O efeito combinado do tempo e temperatura de cozimento sobre os teores de isoflavonas, antocianinas e atividade antioxidante foi avaliado para definir as melhores condições de processamento para a obtenção de extrato de soja preta. Em geral, a temperatura de processamento influencia na extração de compostos fenólicos aumentando a solubilidade dos solutos e os coeficientes de difusão (LUTHRIA, 2008). No entanto, as isoflavonas e, principalmente, as antocianinas podem sofrer alterações quando submetidas a determinadas condições de tempo/temperatura, sendo necessária especial atenção quanto à sua estabilidade durante o processamento (LAFKA, SINANOGLOU e LAZOS, 2007).

4.3.2.1 Análise de antocianinas

Diferentemente do que ocorre para o grão e discutido anteriormente, a literatura em relação ao estudo das antocianinas em extrato de soja preta é ainda muito escassa.

Além disso, os diferentes métodos de processamento utilizados para obtenção dos extratos de soja preta tornam ainda mais difícil a comparação da presença de compostos bioativos entre os dados publicados.

Os teores de antocianinas das sete amostras de extrato de soja preta estudados foram: 56,2 mg/100 g (80 °C/5 min), 43,3 mg/100 g (80 °C/15 min), 52,7 mg/100 g (98 °C/5 min), 49,2 mg/100 g (98 °C/15 min), 44,1 mg/100 g (89 °C/10 min), 44,5 mg/100 g (89 °C/10 min) e 40,7 mg/100 g (89 °C/10 min) (Figura 21).

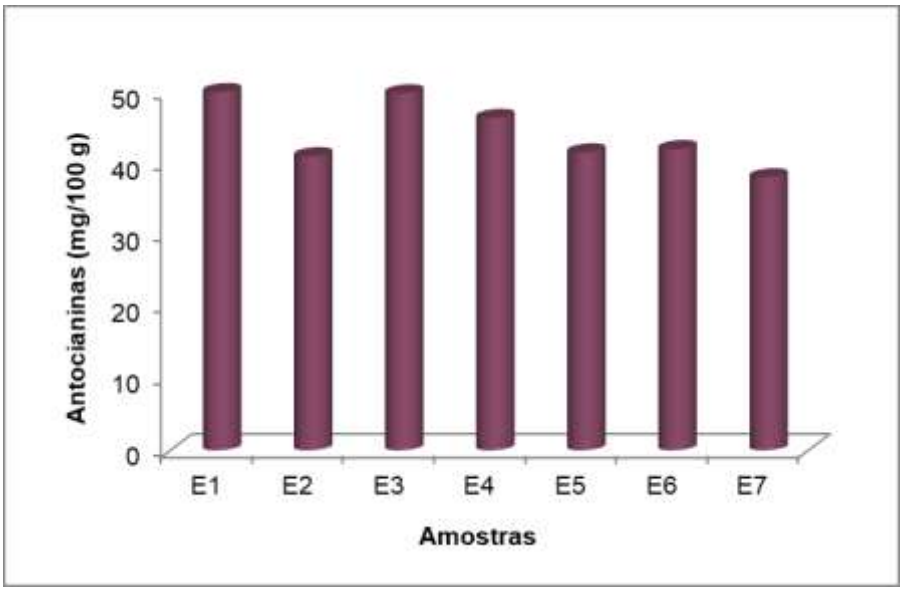


Figura 21. Conteúdo de antocianinas (médias) para os sete tratamentos do extrato de soja preta (E1= 80°C/5 min; E2= 80°C/15 min; E3= 98°C/5 min; E4= 98°C/15 min; E5= 89°C/10 min; E6= 89°C/10 min; E7= 89°C/10 min).

Os resultados deste estudo sugerem que o tempo e a sua interação com a temperatura foram fatores importantes para os teores de antocianina. O diagrama de Pareto (Figura 22) possibilitou visualizar graficamente a contribuição de cada fator e de suas interações. O tempo foi a variável mais importante, seguido pela interação do tempo com a temperatura, ambos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) enquanto o efeito da temperatura isoladamente não foi significativo ($p < 0,05$) na faixa estudada.

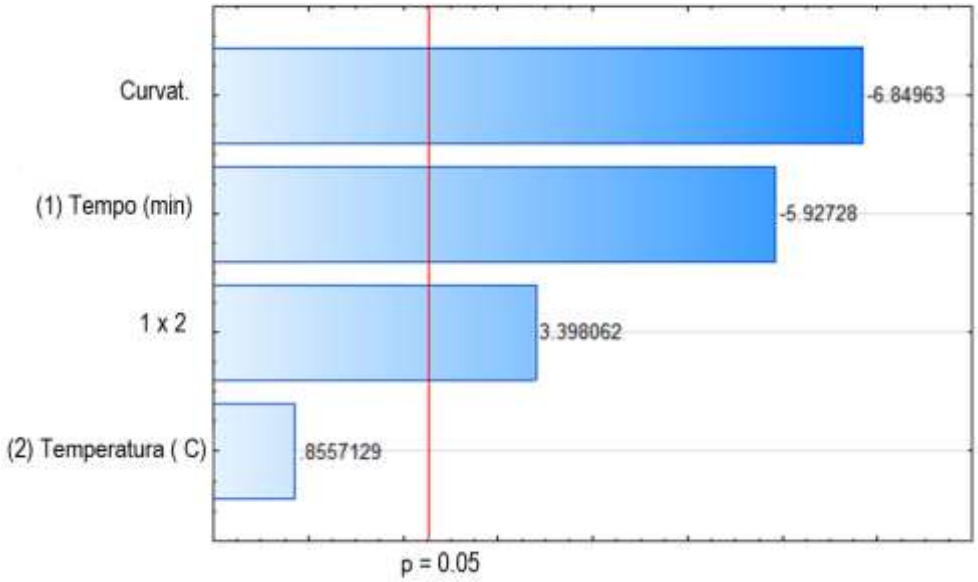


Figura 22. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial 2^2 sobre o teor de antocianinas no extrato de soja preta.

Na Figura 23, é possível observar que tanto para a temperatura de 80 °C quanto para a de 98 °C, o aumento do tempo de exposição a essas temperaturas foi prejudicial para o teor de antocianinas. A condição de cozimento de 80 °C/5 min forneceu o extrato de soja com o maior conteúdo de antocianinas seguido da condição de 98 °C/5 min. De fato, a temperatura pode induzir a degradação desses pigmentos dependendo do tempo de aquecimento a uma temperatura constante (DELGADO-VARGAS, JIMENEZ e PAREDES-LOPEZ, 2000).

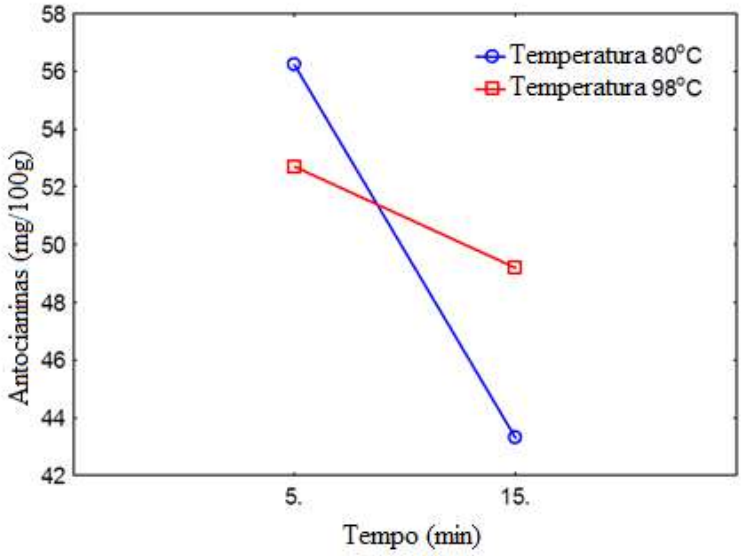


Figura 23. Antocianinas como uma função do tempo (min) e da temperatura (°C) de cozimento.

Xu e Chang (2008b) estudaram o efeito do tempo de cozimento (120 min) na temperatura de ebulição na composição de antocianinas de grãos de soja preta. Os autores detectaram cianidina-3-glicosídeo (36,5 mg/100g) e peonidina-3-glicosídeo (6,3 mg/100 g) na matéria-prima e observaram que o processamento térmico promoveu impacto significativo na sua degradação, uma vez que apenas traços de cianidina-3-glicosídeo (1,0 mg/100 g) e nenhuma peonidina-3-glicosídeo foram detectados em extrato de soja preta submetido às condições do estudo. O mesmo comportamento de degradação foi verificado nos estudos preliminares descritos no Capítulo 3 (item 2.2.1.1) e publicados por ESTEVES *et al*. (2017).

Em sequência, Xu e Chang (2009) avaliaram o efeito de métodos tradicionais de processamento de extrato de soja preta sobre o conteúdo de antocianinas. O extrato foi obtido por meio das seguintes etapas: maceração com água (razão sólido/líquido 1:10, p/v) durante a noite, drenagem, enxague, trituração com água a temperatura ambiente (proporção de água para grãos secos 9:1) por 3 min em blender, separação de sólidos por filtração. Uma amostra do extrato cru foi retirada para análise e o restante foi cozido em fogão na temperatura de ebulição por 20 min e em seguida resfriado em banho de gelo. O teor de antocianinas no extrato cru e após o tratamento térmico não foi

detectável, indicando que o processo de obtenção utilizado não foi adequado ao uso da soja preta.

Objetivando a produção de um produto tipo *petit suisse* de soja preta, De Moraes Filho *et al*. (2014) utilizaram soja preta cultivada na cidade de Uraí-PR-Brasil, safra 2010/2011, para obtenção do extrato de soja preta utilizado no processo de produção do *petit suisse*. Para tal, os grãos (razão 1:8 m/m) foram hidratados e tratados termicamente (80 °C por 10 min), seguidos de trituração, filtração e subsequente tratamento térmico a 98 °C por 5 min. O teor de antocianinas monoméricas foi determinado pelo método de pH diferencial, tendo sido encontrado o valor de 384,69 mg/100g de extrato de soja preta.

O comportamento das antocianinas de soja preta apresentou-se similar aos descritos em estudos com outros alimentos ricos em antocianinas tais como amora, cereja, açaí, entre outros, nos quais também foram encontrados efeitos degradantes da temperatura de aquecimento e do tempo de processamento sobre a estabilidade e conteúdo de antocianinas (PACHECO-PALENCIA, DUNCAN e TALCOTT, 2009; PATRAS et al., 2010; ZORIĆ et al., 2014; TURTURICĂ et al., 2016).

4.3.2.2 Análise de isoflavonas

Como mencionado anteriormente, a soja preta é uma fonte rica em compostos bioativos, incluindo as isoflavonas (CORREA et al., 2010) e as condições de processamento aplicadas à produção de alimentos e ingredientes a base de soja são determinantes no conteúdo final e perfil das isoflavonas (MURTHY *et al*., 1999; LIU, 2004). Portanto, o estudo da influência do tempo e temperatura de cozimento no processamento do extrato é de grande importância para a obtenção de um produto que garanta os benefícios do alimento original.

Os teores de isoflavonas totais, expressos em equivalentes em agliconas, dos extratos de soja preta submetidos a diferentes processos com variação de tempo e temperatura de cozimento foram: 139,9 mg/100 g (80 °C/5 min), 146,4 mg/100 g (80 °C/15 min), 148,3 mg/100 g (98 °C/5 min), 138,7

mg/100 g (98 °C/15 min), 142,3 mg/100 g (89 °C/10 min), 144,7 mg/100 g (89 °C/10 min), 148,7 mg/100 g (89 °C/10 min) (Figura 24).

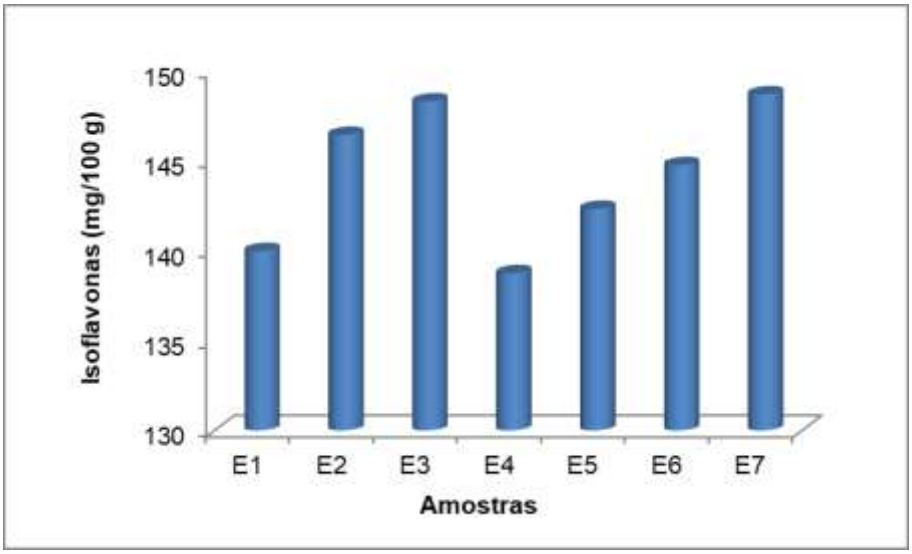


Figura 24. Conteúdo de isoflavonas totais (médias), equivalente em agliconas, para os sete tratamentos do extrato de soja preta (E1= 80°C/5 min; E2= 80°C/15 min; E3= 98°C/5 min; E4= 98°C/15 min; E5= 89°C/10 min; E6= 89°C/10 min; E7= 89°C/10 min).

Como pode ser visto no diagrama de Pareto (Figura 25), as variáveis tempo e temperatura por si só não foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para o conteúdo de isoflavonas. Contudo, houve diferença significativa na interação entre os fatores indicando uma tendência de comportamento na qual a influência do tempo sobre o conteúdo de isoflavonas depende da temperatura de processamento. Na Figura 26, é possível observar a interação entre os fatores, na temperatura de 80 °C o conteúdo de isoflavonas apresenta um aumento relativo com o tempo e na temperatura de 98 °C ela cai drasticamente com o tempo. Essa tendência de comportamento mostra que temperaturas mais altas parecem ser inadequadas para processos de longo tempo.

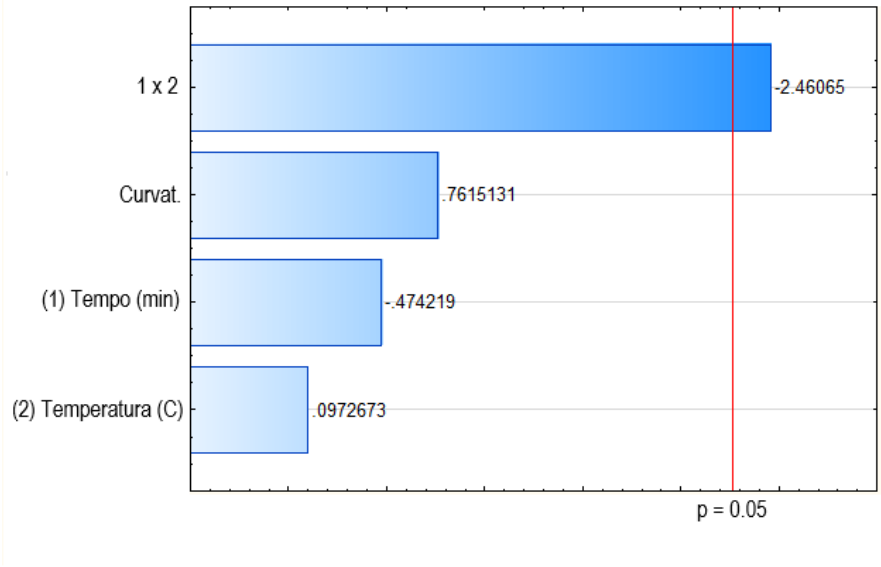


Figura 25. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial 2^2 sobre o teor de isoflavonas no extrato de soja preta.

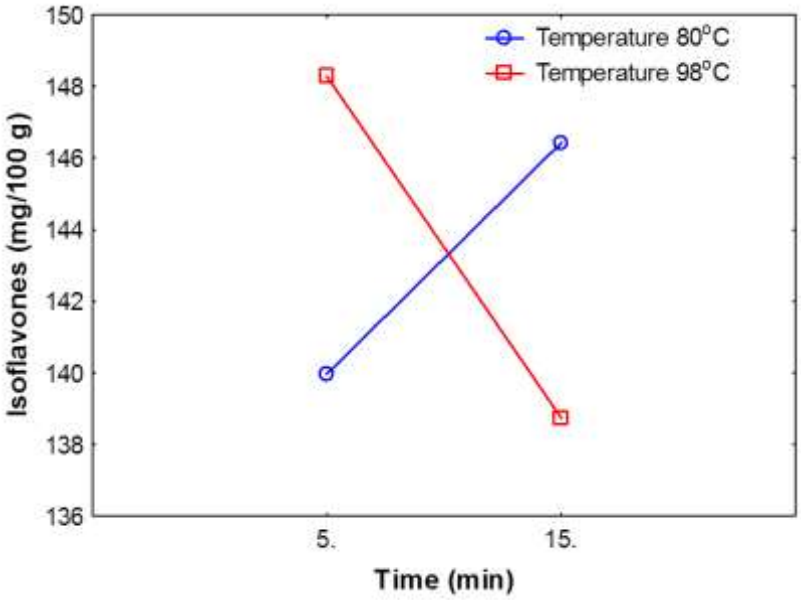


Figura 26. Isoflavonas como uma função do tempo (min) e da temperatura (°C) de cozimento.

Ainda são muito escassos trabalhos sobre a influência do processamento nos compostos bioativos da soja preta e estudos prévios a respeito da influência do tempo e da temperatura de processamento sobre os teores de isoflavonas do extrato de soja amarela ou preta não mostram consenso sobre os resultados.

Tan, Chang e Zhang (2016) estudaram o efeito da etapa de trituração em extrato de soja preta comparando os teores das isoflavonas antes e após cozimento do extrato a 100 °C por 20 minutos. Os autores concluíram que, em média, o cozimento reduziu o teor total de isoflavonas em 35% quando comparado ao extrato original.

Xu e Chang (2009) estudaram o efeito de diferentes processamentos de extrato de soja sobre o conteúdo de isoflavonas de duas cultivares de soja amarela e uma de soja preta. Todos os extratos foram obtidos através das etapas de maceração, drenagem, enxague, trituração com água a temperatura ambiente, filtração, seguido de uma etapa de tratamento térmico que variou. Um dos processos aplicados foi o cozimento à temperatura de ebulição por 20 min e em seguida resfriamento em banho de gelo. Os teores de isoflavonas totais foram avaliados em amostras dos extratos retiradas antes e outra após o cozimento. A etapa de cozimento reduziu o teor de isoflavonas no extrato de soja preta, que apresentou os valores de 122,12 mg/100g antes e 114,4 mg/100g após o cozimento.

Em relação as soja amarelas, os autores (XU e CHANG, 2009) observaram que não houve um mesmo comportamento entre as cultivares estudadas em relação aos processamentos utilizados. Para os extratos de soja amarela, uma das cultivares apresentou diferença significativa entre os valores obtidos para o extrato antes e após o cozimento, 167,3 mg/100g e 178,3 mg/100g, respectivamente. No entanto, para a outra cultivar amarela não houve diferença significativa entre as mesmas condições, sendo 222,2 mg/100g e 220,0 mg/100g antes e após o cozimento respectivamente.

Baú e Ida (2015) avaliaram o efeito do tratamento térmico (97 ± 2 °C) em extrato de soja amarela, variando o tempo de 0 a 25 min, com intervalo de 5 min e também observaram que o conteúdo total de isoflavonas não foi significativamente diferente nas condições do estudo e que as isoflavonas

tiveram o perfil alterado, mas não foram degradadas. Contudo, não foram encontrados dados na literatura sobre o efeito combinado de tempo e temperatura de cozimento sobre os compostos bioativos do extrato de soja preta para comparação com nosso estudo.

4.3.2.3 Estimativa da atividade antioxidante pelo método DPPH

Poucos são os trabalhos que avaliaram a atividade antioxidante de extrato de soja preta e, dentre estes, predominam os estudos com extratos fermentados (CHENG, LIN e LIU, 2011; KIM, LEE e YOO, 2012). Além disso, outras questões também dificultam a comparação de resultados com a literatura tais como as diferentes formas de obtenção dos extratos, diferença nos métodos utilizados para estimar a atividade antioxidante, bem como as diversas formas de expressar os resultados.

Pelo gráfico de Superfície de resposta da atividade antioxidante (DPPH) para extrato de soja preta em função do tempo (min) e temperatura (°C) de cozimento (Figura 27) foi observado que os menores valores de DPPH foram obtidos para os extratos submetidos a maior tempo em menor temperatura de cozimento.

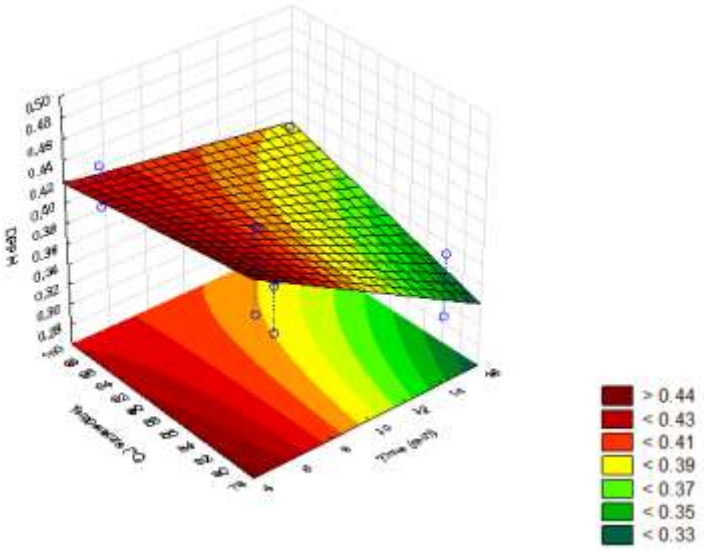


Figura 27. Superfície de resposta da atividade antioxidante (DPPH) para extrato de soja preta em função do tempo (min) e temperature (°C) de cozimento.

Os valores de EC50 obtidos no ensaio de DPPH das sete amostras de extrato de soja preta estudadas foram: E1 = 0,44 mg/L, E2 = 0,34 mg/L, E3 = 0,42 mg/L, E4 = 0,38 mg/L, E5 = 0,33 mg/L, E6 = 0,37 mg/L e E7 = 0,31 mg/L. variaram de 0,31 mg/L (E7 = 89 °C/ 10 min) a 0,42 mg/L (E3 = 98 °C/5 min). Considerando que os resultados do teste DPPH foram expressos como EC50, onde valores mais baixos significam maior atividade antioxidante, o E7 (89°C/10 min) apresentou maior atividade antioxidante pelo método DPPH, enquanto o E1 (E1= 80°C/5 min) apresentou a menor atividade.

Em relação aos resultados de antocianinas e isoflavonas apresentados anteriormente, o E7 apresentou o maior teor de isoflavonas (148,7 mg/100g) e o menor de antocianinas (40,727 mg/100g), enquanto o E1 teve o menor conteúdo de isoflavonas (139,9 mg/100g) e o maior de antocianinas (56,2 mg/100g).

Esses resultados sugerem que as isoflavonas apresentaram maior influência na atividade antioxidante estimada pelo método DPPH do que as antocianinas. Também Xu e Chang (2009) observaram correlação significativa entre os teores de isoflavonas e DPPH em relação aos extratos de soja preta e amarela obtidos por diferentes formas de processamento. Em relação às sojas amarelas, os autores observaram que nas duas cultivares avaliadas, houve aumento dos valores da capacidade antioxidante medida pelo DPPH do extrato cozido em relação ao cru, enquanto para o extrato de soja preta houve redução, indicando um aumento da atividade antioxidante no extrato de soja amarela após o cozimento e uma diminuição dessa atividade para o extrato de soja preta.

De fato, o aumento da atividade antioxidante do extrato de soja submetido a cozimento pode ser atribuído a formação de novos compostos com novas propriedades antioxidantes ou mesmo à conversão de compostos originalmente existentes em formas com maior capacidade antioxidante (NICOLI et al., 1997; XU e CHANG, 2009). Esse comportamento não foi observado para a soja preta podendo ser atribuído ao fato de que as antocianinas, potentes antioxidantes, são facilmente degradadas quanto submetidas a tratamento térmico (XU e CHANG, 2008b).

4.3.2.4 Estimativa da atividade antioxidante pelo método ORAC

Os valores de ORAC das sete amostras de extrato de soja preta estudadas foram: E1 = 23,2 µmol QE/g, E2 = 17,9 µmol QE/g, E3 = 18,6 µmol QE/g, E4 = 19,2 µmol QE/g, E5 = 17,8 µmol QE/g, E6 = 17,6 µmol QE/g e E7 = 15,77 µmol QE/g. No gráfico de superfície de resposta (Figura 28) é possível observar que os maiores valores ORAC foram observados para os extratos submetidos a menor temperatura por menor tempo. De fato, o extrato de soja preta que apresentou maior atividade antioxidante estimada pelo método ORAC foi o E1 (80 °C/5 min).

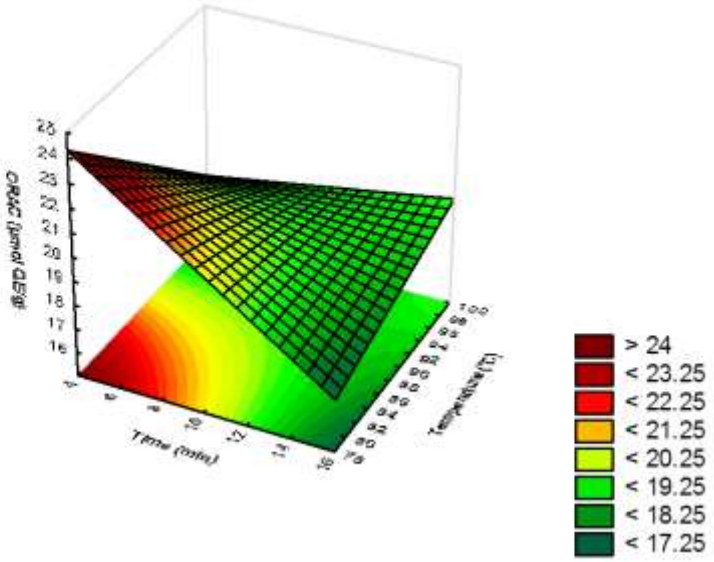


Figura 28. Superfície de resposta da atividade antioxidante (ORAC) para extrato de soja preta em função do tempo (min) e temperatura (°C) de cozimento.

Considerando o valor ORAC da quercetina, os resultados obtidos para o extrato de soja preta também foram estimados em TE para permitir a comparação com dados da literatura sobre extrato de soja preta. Assim, os valores estimados de ORAC variaram de 105,9 (E7) a 155,4 (E1) µmol de TE/g de extrato de soja preta liofilizado.

Xu e Chang (2009) encontraram redução na atividade antioxidante dos extratos após o cozimento (100 °C/20 min), estimada por ORAC, para todas as três cultivares avaliadas (duas amarelas e uma preta). Os valores de ORAC

antes e após o cozimento para os extratos de soja amarela reduziram de 84,6 para 66,9 µmol TE/g para uma das cultivares e de 76,0 a 59,1 µmol TE/g para a outra cultivar. Para o extrato de soja preta o valor de ORAC reduziu de 55,1 para 42,8 µmol TE/g após o cozimento.

A diferença de resultados entre ORAC e DPPH pode ser atribuída às diferenças entre seus mecanismos antioxidantes: a reação de ORAC envolve a transferência de um átomo de hidrogênio enquanto o DPPH envolve preferencialmente a transferência de um elétron (PRIOR et al., 2005). Por outro lado, além dos compostos fenólicos, peptídeos derivados de proteínas de soja também podem apresentar atividade de sequestro do radical DPPH• (XU e CHANG, 2009).

4.3.3 Avaliação de diferentes tratamentos de conservação

Considerando que o grande diferencial da soja preta é a presença das antocianinas e o potencial antioxidante que elas podem agregar aos produtos derivados de soja preta, o extrato E1 obtido por cozimento a 80 °C por 5 min foi o que apresentou o maior teor de antocianinas e maior atividade antioxidante estimada pelo método ORAC. Desta forma este foi definido como o mais adequado para dar continuidade ao estudo de influência do processamento sobre o conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante do extrato de soja preta.

Para definição do tratamento de conservação mais adequado como parte do processamento, duas novas bateladas de extrato de soja preta E1 foram processadas e submetidas a quatro diferentes tratamentos de conservação: T1 = pasteurização 98 °C/ 5 min; T2 = pasteurização 98 °C/ 10 min; T3 = UHT e T4 = APH, e as variáveis dos teores de antocianinas, isoflavonas e estimativa da atividade antioxidante foram comparadas.

Os tratamentos foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) para as variáveis estudadas, exceto para as isoflavonas (tabela 7) que não foram degradadas por condições de pasteurização, UHT ou APH. Como já descrito anteriormente, as isoflavonas são relativamente estáveis ao calor, e o que ocorre, em geral, é uma alteração no perfil, mas não nos teores de isoflavonas

totais (UNGAR *et al*., 2003; VILLARES *et al*., 2011; ANDRADE *et al*., 2016), o que justificaria os resultados encontrados (Tabela 7).

Tabela 7. Médias de compostos bioativos e capacidade antioxidante de extrato de soja preta submetido a quatro tratamentos de conservação diferentes

Tratamentos Térmicos	Isoflavonas	Antocianinas	DPPH	ORAC
	(mg/100g, b.s**)	(mg/100g, b.s)	EC50 (mg/L)	(µmol QE/g)
Controle*	142,51^{a} ± 8,16	40,72^{a} ± 2,74	0,41^{a} ± 0,04	25,53^{a} ± 0,26
T1	140,71^{a} ± 1,73	34,02^{b} ± 0,83	0,37^{a} ± 0,00	24,45^{a} ± 0,56
T2	141,16^{a} ± 1,07	32,75^{b} ± 0,67	0,40^{a} ± 0,00	25,46^{a} ± 0,82
T3	144,79^{a} ± 2,69	32,76^{b} ± 0,54	0,21^{b} ± 0,02	19,58^{b} ± 0,26
T4	140,64^{a} ± 0,01	38,35^{a} ± 0,64	0,29^{c} ± 0,02	20,19^{b} ± 0,57

* Não submetido a nenhum tratamento. Diferentes letras em sobrescrito na mesma coluna significam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), pelo teste de Fisher. Tratamentos: T1: 98 °C/5 min; T2: 98 °C/10 min; T3: UHT (132 °C/6 s); T4: APH (200 MPa/45°C).** Base seca.

Os teores de antocianinas foram semelhantes entre os tratamentos térmicos, mas foram significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparados ao controle (sem tratamento térmico) e ao APH, os quais não diferiram entre si. Isso é consistente, pois as antocianinas apresentam sensibilidade ao calor (PATRAS et al., 2010; ZHOU, CAI, XU, 2017) e o tratamento de APH é uma tecnologia alternativa aos tratamentos térmicos, baseada na aplicação de alta pressão dinâmica (TORO-FUNES et al., 2015)

Para o ensaio de DPPH, os extratos submetidos aos tratamentos de pasteurização T1 e T2 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao padrão, enquanto aqueles tratados por UHT e APH apresentaram atividade antioxidante maior que o padrão e diferentes entre si, tendo o extrato obtido por UHT apresentado menor valor de EC50 e, portanto, maior atividade antioxidante por este método. Xu e Chang (2009) também observaram aumento da atividade antioxidante para os extratos de soja preta tratados por UHT (1,73 µmol de TE/g) em relação ao padrão (1,19 µmol de TE/g) e atribuíram esse resultado ao fato do aquecimento do extrato poder favorecer a formação e alterações em compostos antioxidantes, bem como gerar peptídeos bioativos capazes de aumentar a atividade antioxidante estimada por DPPH.

Os resultados do ensaio de ORAC mostraram que os tratamentos de pasteurização (T1: 98 °C/5 min e T2: 98 °C/10 min) não diferiram entre si e do controle, enquanto os resultados do UHT (T3: 132 °C/6 s) e T4: APH (200 MPa/45°C) foram estatisticamente inferiores ($p < 0,05$), não diferindo entre si. Apenas um trabalho (Xu e Chang, 2009) foi encontrado que avaliou o efeito de tratamentos térmicos de cozimento (100°C por 20min) e UHT (143 °C/60 s) em extrato de soja preta. Os autores verificaram redução no valor de ORAC de 14 % quando o extrato de soja preta foi processado por UHT e de 23% quando submetido ao cozimento.

Nenhum trabalho foi encontrado avaliando o efeito do tratamento com alta pressão (APH) em produtos de soja preta e dentre os estudos realizados com a soja amarela nenhum avaliou atividade antioxidante. Toro-Funes *et al*. (2014) estudaram as mudanças das isoflavonas no extrato de soja submetidos ao tratamento APH e, diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, verificaram um aumento de, aproximadamente, 11 % no conteúdo de isoflavonas totais em relação ao controle. Os autores atribuíram esse aumento a alterações induzidas pela pressão promovendo o desenovelamento (*unfolding*) e a desnaturação da proteína de soja e/ou mudanças nas interações de isoflavonas, contudo o tratamento não apresentou efeito na interconversão de isoflavonas (TORO-FUNES *et al*., 2014).

Apesar de diversos trabalhos (POLISELI-SCOPEL *et al*., 2012, 2013, 2014) terem afirmado o tratamento APH como uma tecnologia adequada de conservação do extrato de soja, os resultados obtidos nas condições testadas neste estudo não se apresentaram de acordo com os padrões microbiológicos sanitários para alimentos segundo a RDC no 12 de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) e, portanto, sua utilização não foi adequada para avaliação sensorial e para a continuidade do estudo. Como visto nos resultados deste trabalho, a tecnologia de alta pressão (APH) apresenta grande potencialidade no processamento de extrato de soja preta, especialmente no que diz respeito à conservação das antocianinas, contudo estudos mais aprofundados e detalhados precisam ser realizados para esse caso.

Os extratos obtidos pelos tratamentos de pasteurização T1 e T2 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si para nenhuma das

variáveis estudadas e sendo assim, a escolha do tratamento de conservação mais adequado foi realizada entre os métodos de pasteurização e UHT. Ambos extratos não apresentaram diferença significativa para o teor de isoflavonas e antocianinas, mas diferiram em relação à atividade antioxidante. Os extratos submetidos à pasteurização não diferiram do controle para a atividade estimada por DPPH, mas apresentaram menor atividade quando comparados ao obtido por tratamento UHT. Para o método ORAC, os extratos pasteurizados igualmente não diferiram do controle, entretanto tiveram atividade antioxidante estimada maior que o extrato submetido à UHT.

Considerando que os extratos pasteurizados não apresentaram diferença do controle para os métodos de avaliação da atividade antioxidante estudados e mostraram atividade superior ao submetido à UHT pelo ORAC, método que parece ter maior correlação com o teor de antocianinas que o DPPH, o tratamento de pasteurização foi definido como mais adequado para dar continuidade ao estudo. Dentre os tratamentos de pasteurização, T1 (98 °C/5 min) utilizou menos tempo e, portanto menos energia que T2 (98 °C/10 min) e por isso foi escolhido para tratamento de conservação do extrato de soja preta a ser utilizado na avaliação sensorial e na sequencia dos estudos desta tese.

4.3.4 Teste de aceitação de bebida de soja preta formulada sabor chocolate

Considerando os resultados dos parâmetros de tempo e temperatura de processamento e dos tratamentos de conservação estudados para obtenção de extrato de soja preta, as etapas de cozimento a 80 °C por 5 min e pasteurização a 98 °C por 5 min foram definidas como as melhores condições para a manutenção de compostos bioativos e da capacidade antioxidante. Por essa razão, esse foi o produto formulado para ser avaliado sensorialmente pelos consumidores.

A aceitabilidade do consumidor para as bebidas de soja sabor chocolate revelou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras avaliadas (Figura 29). A marca líder de mercado atingiu o mais elevado valor médio de aceitação

(6,9) e diferiu da bebida comercial de soja orgânica (4,5) e da bebida de soja preta (4,3). No entanto, não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) entre a bebida orgânica e a experimental de soja preta.

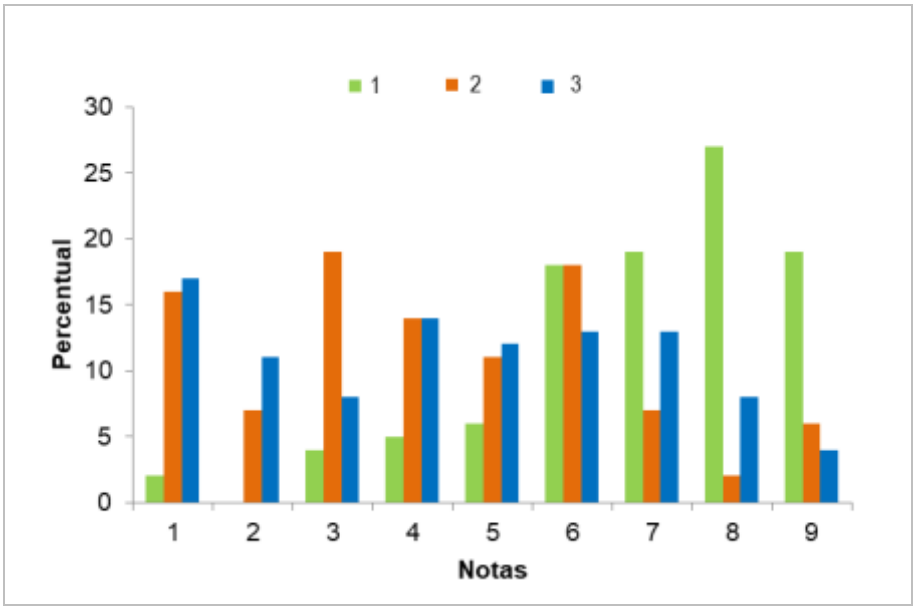


Figura 29. Distribuição percentual das notas dos participantes para bebidas de soja sabor chocolate (1 = bebida de soja comercial líder ; 2 = bebida experimental de soja preta; 3 = bebida de soja comercial orgânica), avaliadas usando escala hedônica de 9 pontos.

Uma vez que o gosto do consumidor é, geralmente, heterogêneo e os dados da média do consumidor podem não representar qualquer opinião individual, a análise de cluster foi aplicada para visualizar a existência de grupos com pontuações de aceitação semelhantes. Nessa análise foram revelados três segmentos de consumidores nos quais houve diferença ($p \leq 0,05$) de aceitação das amostras (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios de aceitação§ de bebida de soja preta experimental sabor chocolate e duas bebidas de soja comerciais sabor chocolate para cada um dos três subgrupos de preferências (*clusters*)

Amostra	Segmentos de consumidores		
	Cluster 1 (n=24)	*Cluster* 2 (n=36)	*Cluster* 3 (n=40)
Bebida de soja comercial líder	$8,0^{a}$	$6,3^{b}$	$6,7^{b}$
Bebida experimental de soja preta	$6,7^{b}$	$1,9^{d}$	$4,9^{c}$
Bebida de soja comercial orgânica	$7,2^{ab}$	$2,6^{d}$	$4,5^{c}$

§ Avaliada por escala hedônica de 9 pontos variando de 1: não gostei extremamente até 9: gostei extremamente. Diferentes letras em sobrescrito significam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0.05$) pelo teste de Fisher.

Os consumidores do cluster 1 (n = 24), correspondentes a 24% de todos os participantes, apresentaram pontuações mais altas para todas as amostras, com pontuação média de aceitação ≥ 6,0 (gostei ligeiramente) em uma escala hedônica de 9 pontos. Os consumidores do cluster 2 (n = 36), representados por 36% de todos os provadores, gostaram ligeiramente da marca comercial líder (6,3) e obtiveram baixas pontuações para a bebida de soja preta (1,9) e para a bebida comercial orgânica (2,6). Os consumidores do cluster 3 (n = 40), o maior segmento, gostaram ligeiramente da marca líder (média 6,7), mas nem gostaram nem desgostaram da bebida de soja preta e da bebida comercial orgânica.

Os resultados sobre a frequência de consumo de produtos de soja revelaram que os consumidores do *cluster* 1 relataram consumo esporádico, enquanto que os dos grupos 2 e 3 declararam que raramente consumiam produtos de soja. Esses resultados sugerem que a aceitação do consumidor pode ser correlacionada com a frequência do consumo de produtos de soja (KRÓLAK *et al*., 2017), uma vez que indivíduos no cluster 1 apresentaram pontuações mais altas para todas as bebidas avaliadas. Por outro lado, os consumidores que declararam baixo consumo de produtos de soja deram pontuações médias mais baixas. De fato, conforme descrito na literatura, muitos estudos foram realizados para melhorar as características sensoriais dos produtos de soja de acordo com as preferências do mercado local para aumentar a aceitação do consumidor (FELBERG *et al*., 2009).

A bebida de soja comercial líder apresentou altas médias de aceitação nos três segmentos de consumidores. Uma possível explicação para as diferenças observadas na aceitação pode ser atribuída à formulação dos produtos. As estratégias tecnológicas comumente usadas para melhorar a palatabilidade das bebidas de soja incluem o uso de uma grande variedade de ingredientes como aromatizantes, edulcorantes, espessantes, entre outros (WANG *et al*., 2001).

Vale ressaltar que apenas o achocolatado em pó foi adicionado à bebida de soja preta para a avaliação de aceitação, ou seja, nenhuma outra melhoria da formulação foi realizada. Sendo assim, a bebida de soja preta é um produto com potencial para ser lançado no mercado, uma vez que não diferiu no desempenho de aceitação quando comparado com uma bebida de soja comercial orgânica, um produto já estabelecido no mercado. Além disso, sua formulação pode ser melhorada para obter uma bebida de soja preta com atributos sensoriais de acordo com as preferências do consumidor.

4.4 CONCLUSÕES

- ✓ Tempo e temperatura de cozimento desempenharam um papel importante sobre os teores de antocianinas e atividade antioxidante do extrato de soja preta; temperatura de 80 °C por 5 min foi a mais adequada para produção de extrato de soja preta com maior teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante.
- ✓ Todos os tratamentos de conservação estudados foram capazes de preservar as isoflavonas do extrato de soja preta.
- ✓ O processo de alta pressão (APH) manteve o conteúdo de antocianinas do extrato de soja preta quando comparado ao controle (sem tratamento), enquanto os extratos submetidos à pasteurização e UHT apresentaram uma perda de 20 % no teor de antocianinas.

- ✓ A pasteurização à temperatura de ebulição durante 5 e 10 minutos mostrou ser um tratamento térmico adequado para preservar a atividade antioxidante sem perda em relação ao controle ($p \leq 0,05$).
- ✓ A bebida de soja preta desenvolvida formulada sabor chocolate apresentou aceitação similar à de uma bebida orgânica comercial.

4.5 REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M., Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. Química Nova, v.33, n10, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE, J. C.; MANDARINO, J. M.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I., The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. Food Chemistry, v. 194, p. 1095-1101, 2016.

AOAC (2005). Official methods of analysis: AOAC (18th ed.). Washington, DC: AOAC.

BAÚ, T. R., IDA, E. I. Soymilk processing with higher isoflavone aglycone content. Food Chemistry, v.183, p.161-168, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC no 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção I, p. 45-53.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC no 91, de 18/10/2000. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de alimento com soja. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 out. 2000, Seção I, p. 29.

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. Revista Agropecuária Brasileira, v.58, n.8, p.897-902, 2003.

CHENG, K. C.; LIN, J. T.; LIU, W. H., Extracts from fermented black soybean milk exhibit antioxidant and cytotoxic activities. Food Technology and Biotechnology, v.49 n.1, p. 111-117, 2011.

CHO, K.M.; HA, T, J.; LEE, Y. B.; SEO, W. D.; KIM, J. Y.; RYU, H. W.; JEONG, S. H.; KANG, Y. M., LEE, J. H. Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (Glycine max L.) cultivars with varying seed coat colours. Journal of Functional Foods, v.5, p. 1065-1076, 2013.

CORREA, C. R.; LI, L.; ALDINI, G.; CARINI, M.; OLIVER CHEN, C. Y.; CHUN, H.-K.; CHO, S.-M.; PARK, K.-M.; RUSSELL, R. M.; BLUMBERG, J. B.; YEUM, K.-J., Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybeans (Glycine max). Food Chemistry, v.123, n.4, p. 1176-1184, 2010.

DE MORAES FILHO, M. L., HIROZAWA, S. S., PRUDENCIO, S. H., IDA, E. I., GARCIA, S. Petit Suisse from black soybean: bioactive compounds and antioxidant properties during development process. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v.65, p.470-475, 2014.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENEZ, A. R.; PAREDES-LOPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.40, p.173-289, 2000.

ESTEVES, T. C. F.; FELBERG, I.; CALADO, V. M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Effect of black soymilk processing conditions on anthocyanins content. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, v.11, n.2, p. 56-60, 2017.

FELBERG, I., ANTONIASSI, R., DELIZA, R., DE FREITAS, S. C., & MODESTA, R. C. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.29, p.609-617, 2009.

GÓES-FAVONI, S. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELEIA, A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. Food Chemistry, London, v.119, n.4, p. 1605-1612, 2010.

GOPALAN, C.; BALASUBRAMANIAN, S. C.; RAMA SASTRI, B. V. (1989). National Institute of, N., Nutritive value of Indian foods. National Institute of Nutrition, Indian Council of Medical Research: Hyderabad, India, 1989; p 156 p.

GOUVÊA, A. C. M. S.; MELO, A.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PEIXOTO, F. M.; FREITAS, V.; GODOY, R. L. O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from Neomitranthes obscura (DC.) N.

Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. Food Chemistry, v.185, p.277-283, 2015.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, v.96, p.67-202, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, p.4437-4444, 2002.

ITAL (2010) INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS –. Brasil Food Trends 2020. São Paulo: ITAL/FIESP, 2010. 173 p. Disponível em: <www.brasilfoodtrends.com.br>. Acesso em: 10 jul. 2017.

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, n.4, p.1112-1116, 2010.

KIM, D. M.; LEE, H.; YOO, S. H. Compositional changes and physical properties of soymilk prepared with pre-soaked-fermented soybean. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, v.55, n.1, p.121-126, 2012.

KIM, E.-H., LEE, O.-K., KIM, J. K., KIM, S.-L., LEE, J., KIM, S.-H., CHUNG, I.-M. Isoflavones and anthocyanins analysis in soybean (Glycine max (L.) Merill) from three different planting locations in Korea. Field Crops Research, v.156, p.76-83, 2014.

KIM, S. Y.; WI, H.-R.; CHOI, S.; HA, T. J.; LEE, B. W.; LEE, M. Inhibitory effect of anthocyanin-rich black soybean testa (Glycine max (L.) Merr.) on the inflammation-induced adipogenesis in a DIO mouse model. Journal of Functional Foods, v.14, p.623-633, 2015.

KOH, K.; YOUN, J. E.; KIM, H. S. Identification of anthocyanins in black soybean (Glycine max (L.) Merr.) varieties. Journal of Food Science and Technology, v.51, p.377-381, 2014.

KRÓLAK, M., JEZEWSKA-ZYCHOWICZ, M., SAJDAKOWSKA, M. Impact of consumer eating habits and fiber content on acceptance of plain wheat rolls. Cereal Foods World, v.62, n.2, p.59-64, 2017.

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. K.; PRATAP, D. BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in

soybean with varying seed coat colour. Food Research International, v.43, n.1, p.323-328, 2010.

LAFKA, T.-I.; SINANOGLOU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. Food Chemistry, v.104, n.3, p.1206-1214, 2007.

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, n.1, p.161-169, 2012.

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, K. J.; LEE, J-R.; MA, K-H.; CHO, Y-H.; LEE, G-A.; CHUNG, J-W. Anthocyanin and isoflavone contents in Korean black soybean landraces and their antioxidant activities. Plant Breeding and Biotechnology, v.4, n.4, p.441-452, 2016.

LEE, Y. J.; YOON, W. B. Flow behavior and hopper design for black soybean powders by particle size. Journal of Food Engineering, v.144, p.10-19. 2015.

LIU, K. (1999). Nonfermented oriental soyfoods. In LIU, K. (Ed.). Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization. New York: Aspen Publishers, 1999. 532p.

LIU, K. (2004). Soybean as a powerhouse of nutrients and phytochemicals. In: LIU, K. (Ed.) Soybeans as functional foods and ingredients. Champaign, Illinois: AOCS Press. p. 1-22, 2004.

LÚCIO, M.; NUNES, C.; GASPAR, D.; FERREIRA, H.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. Antioxidant activity of vitamin E and Trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies in vitro. Food Biophysics, v.4, p.312-320, 2009.

LUTHRIA, D. L. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (Petroselinum crispum) flakes using a pressurized liquid extractor. Food Chemistry, v.107, p.745-752, 2008.

MACFIE, H. J. H. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. Journal of Sensory Studies, v.4, n.2, p.129-148, 1989.

MALENČIĆ, D.; CVEJIĆ, J.; MILADINOVIĆ, J. Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from central Europe. Journal of Medicinal Food, v.15, n.1, p.89-95, 2012.

MATHIAS, K.; ISMAIL, B.; CORVALAN, C. M.; HAYES, K. D., Heat and pH Effects on the Conjugated Forms of Genistin and Daidzin Isoflavones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, n.20, p.7495-7502, 2006.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. Sensory evaluation techniques, 1991. 354p. 2ed. Florida – USA: CRC Press

MULLIN, W.J.; W. XU. Study of soybean seedcoat components and their relationship to water absorption. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.49, p.5331-5335, 2001.

MURPHY, P. A.; BARUA, K.; HAUCK C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. Journal of Chromatography B, Amsterdam, v.777, p.129–138, 2002.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. T.; FRANCESCHI, S.; LERICI, C. R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. Cancer Lett, v.114, n.1-2, p.71-74, 1997.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açaí species, Euterpe oleracea and Euterpe precatoria. Food Chemistry, v.115, p.1199-1205, 2009.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Trends in Food Science & Technology, v.21, p.3-11, 2010.

PEREIRA, J. N. Avaliação de diferentes linhagens de soja preta quanto as suas características físico-químicas, nutricionais e compostos bioativos. Dissertação de mestrado, Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2015.

POLISELI-SCOPEL, F. H.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. LWT - Food Science and Technology, v.46, n.1, p.42-48, 2012.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

SANTANA, A. C.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; DA SILVA, J. B.; IDA, E. I. Effect of harvest at different times of day on the

physical and chemical characteristics of vegetable-type soybean. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.32, n.2, p.351-356, 2012.

SHIH, M. C.; YANG, K. T.; KUO, S. T. Optimization process of black soybean natto using response surface methodology. Journal of Food Science, v.74, n.6, M294-301, 2009.

SLAVIN, M.; KENWORTHY, W.; YU, L. L. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of Maryland-grown soybeans with colored seed coats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.57, n.23, p.11174-85, 2009.

SOARES, N. Mesmo consolidadas no mercado, empresas aumentam o portfólio de bebidas à base de soja para atrair o consumidor. Engarrafador Moderno, set./2011, p.13-18.

TACO (2011). NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO - NEPA. Tabela brasileira de composição dos alimentos - TACO. 4ed. Campinas:NEPA/UNICAMP, 2011. Disponível em: < https://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada >. Acesso em 10 de jul. de 2017.

TAKAHASHI, R.; OHMORI, R.; KIYOSE, 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, n.11, 4578-4582, 2005.

TAN, Y.; CHANG, S. K. C.; ZHANG, Y. Innovative soaking and grinding methods and cooking affect the retention of isoflavones, antioxidant and antiproliferative properties in soymilk prepared from black soybean. Journal of Food Science, v.81, p.1016-1023, 2016.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M T. VIDAL-CAROU, M. C. Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurized by ultra-high-pressure homogenization throughout storage. Food Chemistry, v.162, p.47-53, 2014.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M T. VIDAL-CAROU, M. C. Isoflavone profile and protein quality during storage of sterilized soymilk treated by ultra high pressure homogenisation. Food Chemistry, v.167, p.78-83, 2015.

TURTURICĂ, M.; STĂNCIUC, N.; BAHRIM, G.; RÂPEANU, G. Investigations on Sweet Cherry Phenolic Degradation During Thermal Treatment Based on Fluorescence Spectroscopy and Inactivation Kinetics. Food and Bioprocess Technology, p.1-10, 2016.

UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O.F.; SHIMONI, E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.51, n.15, p. 4394-4399, 2003.

USDA (2008). USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods. Disponível em: < https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400525/Data/isoflav/Isoflav_R2.pdf> Acesso em 10 de jul. de 2017.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E. MARTÍNEZ, J. A., Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process. Food and Bioprocess Technology, v.4, n.1, p.27-38, 2011.

WANG, B., XIONG, Y.L., WANG C. Physicochemical and sensory characteristics of flavored soymilk during refrigeration storage. Journal of Food Quality, v.24, n.6, p.513–526, 2001.

WANG, D.; MA, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, X. Thermal characterization of the anthocyanins from black soybean (Glycine max L. Merrill) exposed to thermogravimetry. Food Science and Technology, v.55, p. 645-649, 2014.

XU, B., CHANG, S. K. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, p.8365-8373, 2008a.

XU, B., CHANG, S. K. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, p.7165-7175, 2008b.

XU, B.; CHANG, S. K. Isoflavones, Flavan-3-ols, phenolic acids, total phenolic profiles, and antioxidant capacities of soy milk as affected by ultrahigh-temperature and traditional processing methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.57, p.4706-4717, 2009.

YUAN, S., CHANG, S. K., LIU, Z., XU, B. Elimination of trypsin inhibitor activity and beany flavor in soy milk by consecutive blanching and ultrahigh-temperature (UHT) processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, p.7957-7963, 2008.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y.; TANG, X. J.; DENG, Y. Y.; CHI, J. W. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (Glycine max L.

Merr.) varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.59, p.5935-5944, 2011.

ZHANG, Y., CHANG, S. K. C., LIU, Z. Isoflavone profile in soymilk as affected by soybean variety, grinding, and heat-processing methods. Journal of Food Science, v.80, p.983-988, 2015.

ZHOU, R.; CAI, W.; XU, B. Phytochemical profiles of black and yellow soybeans as affected by roasting. International Journal of Food Properties, p.1-12, 2017.

ZORIĆ, Z.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; PEDISIĆ, S.; KURTANJEK, Ž.; ELEZ GAROFULIĆ, I. Kinetics of the Degradation of Anthocyanins, Phenolic Acids and Flavonols During Heat Treatments of Freeze-Dried Sour Cherry Marasca Paste. Food Technology and Biotechnology, v.52, n.1, p.101-108, 2014.

CAPITULO 5 OBTENÇÃO DE EXTRATO FERMENTADO DE SOJA PRETA COM PROBIÓTICOS E AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SOBRE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E VIABILIDADE DA CULTURA UTILIZADA ATÉ 28 DIAS DE ARMAZENAMENTO

5.1 INTRODUÇÃO

A fermentação de produtos de soja é tradicionalmente conhecida por trazer vantagens nutricionais e sensoriais a esses alimentos. Nesse contexto incluem-se as bebidas fermentadas de soja. Durante a fermentação, são produzidos compostos que conferem características sensoriais agradáveis, melhorando a aceitabilidade do extrato de soja (CHUN, KIM e KIM , 2008). Pode ocorrer também a redução do teor de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) (LI *et al*., 2012) e o aumento da biodisponibilidade das isoflavonas em função da conversão de espécies glicosídicas em aglicona (LEE *et al*., 2015).

A utilização de culturas probióticas tem sido um grande diferencial no desenvolvimento de produtos com potenciais benefícios à saúde, além da nutrição. Dentre as espécies microbianas bem estudadas que mostraram efeitos benéficos ao hospedeiro está o *L. acidophilus* (HILL *et al*., 2014).

Contudo, a soja preta é um tipo de soja com características particulares devido à presença de antocianinas na casca, compostos reconhecidos pelo seu potencial antioxidante, porém bastante instáveis a diferentes condições de temperatura e tempo de processamento (XU e CHANG, 2009).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da fermentação do extrato de soja preta com *L. acidophilus* sobre a composição centesimal, oligossacarídeos, antocianinas, isoflavonas e estimativa da capacidade antioxidante. Além disso, foram estudados a aceitação sensorial do produto após obtenção e as características de pH, acidez, oligossacarídeos,

antocianinas, isoflavonas e viabilidade da cultura probiótica durante período de armazenamento de 28 dias.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Matérias-primas

O grão de soja preta da mesma linhagem (BRM09-50995) utilizada nos experimentos descritos no Capítulo 4, porém colhida na safra (2014/2015), foi empregado para a obtenção do extrato de soja preta fermentado com culturas probióticas.

A cultura probiótica de *L. acidophilus* (Nu-trish® LA-5®) (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda, Valinhos – SP) foi utilizada para a fermentação dos extratos de soja.

Preparados de frutas nos sabores ameixa preta, morango e uva (Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul – SC) foram utilizados na saborização do extrato de soja preta fermentado para submissão ao teste de aceitação do consumidor.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Obtenção do extrato hidrossolúvel de soja preta (EHSP)

O extrato de soja preta foi obtido de acordo com as condições de processamento definidas no Capítulo 4. Para tanto, os grãos de soja preta foram selecionados, lavados com água corrente, secos em estufa a 70 °C por 5 minutos e moídos em moinho martelo (Perten Laboratory Mill 3100). Em seguida, os grãos moídos foram imersos em água (1:10 m/m) a 80 °C e mantidos em banho sob a mesma temperatura durante 5 min. Após o cozimento, a mistura dos grãos e a água de cozimento foi homogeneizada em Waring® blender por 2 min em velocidade baixa (Low) do equipamento, centrifugada para separação do extrato solúvel (IEC Model K7165; filtro de nylon 150 µm; V = 4000 rpm; t = 5 min) e pasteurizada a 98 °C por 5 min. Após a pasteurização, o extrato foi resfriado em banho de gelo até atingir 45°C e mantido em banho termostático, sem agitação, a 42 ± 2 °C.

5.2.2.2 Obtenção do extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) com probióticos

A primeira etapa do processo de fermentação consistiu na preparação do inóculo da cultura probiótica de acordo com a metodologia descrita por Walter *et al*. (2016). A cultura liofilizada (0,08 % p/v) foi hidratada em solução de cloreto de sódio (0,5% p/v). Em seguida, o inóculo foi adicionado ao extrato de soja a 42 ± 2 °C, homogeneizado por 60 s e mantido em repouso, em banho termostático, até atingir pH final de 4,8, quando a fermentação foi considerada completa. Após o tempo de incubação, o produto foi resfriado em câmara frigorífica (8 ± 2 °C) para desacelerar o processo de fermentação, garantir características sensoriais desejáveis e manter a contagem de bactérias probióticas adequadas.

Parte das amostras dos extratos foi analisada logo após o processamento (análises microbiológicas, pH e acidez) e parte foi liofilizada e conservada a -18°C para análises de composição centesimal, antocianinas, isoflavonas e atividade antioxidante.

5.2.2.3 Caracterização dos grãos de soja, do extrato de soja preta e da okara

A composição centesimal, o teor de antocianinas, as isoflavonas e a estimativa da capacidade antioxidante foram determinados no grão de soja preta, no extrato de soja preta (EHSP), no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) e na okara, coproduto do processamento do EHSP. Todas as metodologias utilizadas nessa avaliação foram previamente descritas no Capitulo 4.

5.2.2.4 Avaliação do efeito do processo de fermentação e caracterização do produto fermentado durante o período de armazenamento

Para avaliação do processo de fermentação e caracterização do produto fermentado, foram realizadas análises no extrato de soja preta (EHSP) recém-processado e nos extratos fermentados de soja preta (EHSP ferm) ao longo de 28 dias de armazenamento (t=0, t=14 e t=28) em câmara frigorífica (8 ± 2 °C).

Composição centesimal

A composição centesimal foi determinada no extrato de soja preta (EHSP) e no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) recém-processados conforme metodologias descritas no Capítulo 4 (item 4.2.2.1).

Análise de açúcares

A determinação dos açúcares no extrato de soja preta (EHSP) recem processado e no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) ao longo do armazenamento foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência Alliance 2690/5 (Waters Corportation, Massachusetts, USA) composto por detector de índice de refração (CLAE-IR) W 2410 (Waters Corporation), segundo metodologia descrita por Macrae (1998). Um grama de amostra foi pesado em balão volumétrico de 25 mL, solubilizado com 10 mL de água Milli-Q e levado ao ultrassom por 20 minutos para a extração dos açúcares. Em seguida, foram adicionados ao balão 5 mL de acetonitrila, completando-se o volume com água Milli-Q. A separação cromatográfica foi realizada em coluna ZORBAX Carbohydrate (4,6mm x 250mm; 5µm) (Agilent Technologies, Dalaware, USA) com fase móvel composta de acetonitrila:água (75:25) com vazão volumétrica de 1,4 mL/min. Os açúcares foram identificados com base no comportamento cromatográfico e resposta do detector, comparados com padrões analisados nas mesmas condições das amostras e com dados disponíveis na literatura. A quantificação dos açúcares foi realizada por meio de curva de calibração elaborada com padrões de rafinose, estaquiose e sacarose (Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA) com pureza de 98%.

Determinação de pH e acidez

Os valores de pH foram determinados no extrato de soja preta (EHSP) recém-processado e no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) ao longo do armazenamento por método eletrométrico, conforme o método 981.12 da AOAC (2010). A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia 6.1.2.1 do Instituto Adolfo Lutz (1985).

Enumeração de células probióticas viáveis de L. acidophilus

A contagem total de bactérias lácticas no extrato fermentado de soja preta fermentada (EHSP ferm) foi realizada ao longo do armazenamento pelo método de contagem em placa. Foram realizadas diluições seriadas para garantir a contagem do número de colônias na placa (THARMARAJ, 2003). Assim, 10 mL de cada amostra foram transferidos para um frasco contendo água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) e a partir dessa diluição inicial, foram realizadas seis diluições sucessivas. Uma alíquota de 1 mL das diluições 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6} foi semeada em placa de Petri com meio MRS, utilizando a técnica de semeadura em profundidade (pour-plate) com adição de sobrecamada. As placas contendo *Lactobacillus acidophilus* foram incubadas em estufas, a 35 °C por 48 h, conforme descrito por International Dairy Federation - IDF (1995).

Análise de antocianinas

A avaliação do perfil e do conteúdo de antocianinas foi realizada no extrato de soja preta (EHSP) recém-processado e no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) ao longo do armazenamento conforme descrito anteriormente no item 4.2.2.4.

Análise de isoflavonas

A determinação do perfil e do conteúdo de isoflavonas foi realizada no extrato de soja preta (EHSP) recém-processado e no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) ao longo do armazenamento conforme descrito anteriormente no item 4.2.2.5.

Estimativa da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada no extrato de soja preta (EHSP) recém-processado e no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) ao longo do armazenamento por meio de ensaio de DPPH, de acordo com metodologia descrita no item 4.2.2.6.

Estimativa da atividade antioxidante pelo método ORAC

A atividade antioxidante foi avaliada no extrato de soja preta (EHSP) recém-processado e no extrato fermentado de soja preta (EHSP ferm) ao longo do armazenamento por meio de ensaio de ORAC, de acordo com metodologia descrita no item 4.2.2.7.

5.2.2.5 Avaliação da inativação de fatores antinutricionais

A atividade ureática do EHSP, do EHSP ferm e da okara foi avaliada pelo método AOCS-2009: Ba 9-58 (AOCS, 2009), que se baseia em medir a mudança no pH, provocada pela formação de amônia quando o produto é incubado com uma solução tamponada de uréia (Uréia + H_2O + urease = CO_2 + NH_3).

5.2.2.6 Aceitação sensorial de bebidas fermentadas de soja preta

A aceitabilidade do extrato fermentado de soja preta foi avaliada em teste de aceitação do consumidor. Quatro amostras foram preparadas a partir do extrato fermentado, sendo uma delas a bebida fermentada adoçada com 12 % m/m de açúcar (código 530) e as demais as bebidas fermentadas com 20 % m/m de preparado de frutas nos sabores: ameixa preta (código 397), morango (código 732) e uva (código 852) (Figura 30).

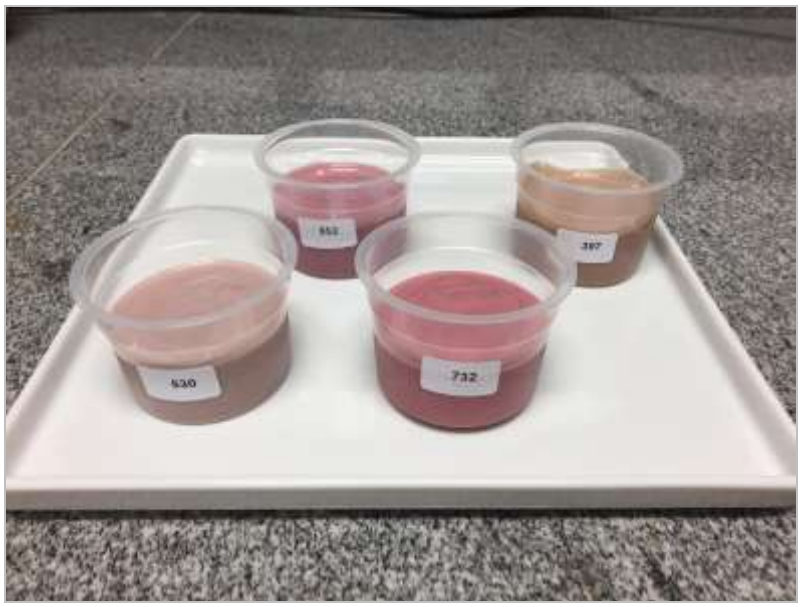


Figura 30. Amostras de bebidas fermentadas de soja preta formuladas com açúcar (530), preparado de fruta sabor morango (732), preparado de fruta sabor ameixa preta (397) e preparado de fruta sabor uva (852).

O teste de aceitação das bebidas fermentadas de soja foi realizado por 103 consumidores (62 do sexo feminino e 41 do sexo masculino) com idades entre 18 e 68 anos, recrutados entre funcionários e alunos, no Laboratório de Sensorial da Embrapa Agroindústria de Alimentos, usando escalas hedônicas estruturadas de 9 pontos onde 1: desgostei extremamente e 9: gostei extremamente (Meilgaard *et al*., 1991).

As bebidas fermentadas foram apresentadas em ordem sequencial monádica a 8 ± 2 °C, em copos de plástico de 50 mL codificados com números de três dígitos. A ordem da apresentação da amostra foi equilibrada para evitar efeitos de transição (MacFie *et al*., 1989). Água potável foi fornecida para enxaguar a boca entre as amostras. Os provadores preencheram um questionário para fornecer informações gerais sobre sua idade, gênero e frequência de consumo de produtos de soja.

Os dados foram analisados, utilizando o programa XLSTAT-MX (2011), por análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher (LSD) para identificar diferenças significativas entre médias ($p \leq 0,05$). A análise hierárquica de cluster foi utilizada para identificar consumidores com diferentes classificações de aceitação para as bebidas fermentadas de soja. Foram consideradas as distâncias euclidianas e o critério de agregação de Ward.

O delineamento experimental do estudo sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) (CAAE: 55617516.2.0000.5282). A qualidade higiênico-sanitária foi avaliada previamente à avaliação sensorial, de acordo com os critérios e padrões microbiológicos para alimentos de consumo humano fixados pela Resolução RDC n°. 12, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), utilizando metodologia determinado por American Public Health Association - APHA (2001).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Caracterização dos grãos, extrato (EHSP) e okara de soja preta

O grão de soja preta BRM 09-50995 (SP), o extrato de soja preta (EHSP), obtido por processo definido neste trabalho (Capítulo 4), e o coproduto (okara) resultante da fabricação do extrato foram avaliados quanto a sua composição centesimal, teor de antocianinas, teor de isoflavonas e estimativa da atividade antioxidante. Ainda que a okara não tenha sido utilizada como matéria-prima em nenhum processo neste estudo, sua caracterização objetivou avaliar seu valor nutricional como potencial ingrediente.

5.3.1.1 Composição centesimal do grão, EHSP e okara de soja preta

A composição dos grãos de soja preta pode variar em função da cultivar, do estádio de maturação, de fatores ambientais e de condições de armazenamento como já foi discutido no item 4.3.1.1. Por outro lado, a composição do EHSP e da okara gerada durante o processo dependem também do processamento ao qual foram submetidos (LIU, 2008).

Na Tabela 9, estão apresentados os valores de macro nutrientes presentes na matéria-prima, no produto e no coproduto.

Tabela 9. Composição centesimal do grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta

Componentes	Composição centesimal (g/100g), em base seca		
	SP	EHSP	Okara
Proteínas	43,34 ± 0,07	49,42 ± 0,17	24,56 ± 0,06
Carboidratos*	31,34 ± 0,43	27,40 ± 0,17	60,95 ± 0,05
Cinzas	5,42 ± 0,23	5,84 ± 0,01	3,53 ± 0,00
Extrato Etéreo	19,90 ± 0,13	17,35 ± 0,01	10,97 ± 0,11

*Carboidratos = [100 – (proteínas + cinzas + extrato estéreo)].

O grão de soja preta utilizado como matéria-prima nesta etapa da pesquisa apresentou composição muito semelhante à composição do grão de mesma variedade da safra anterior, utilizado na etapa descrita no Capitulo 4 deste trabalho. Considerando que os resultados foram apresentados em base seca, a composição centesimal da soja preta está em consonância com dados da literatura que reportam que a soja apresenta cerca de 40 % de proteínas, 23 % de carboidratos, 20 % de lipídeos, 5 % de minerais, 4 % de fibras e 8 % de umidade (ALI, 2010). Conforme já discutido no Capítulo 4, a composição média de macronutrientes da soja preta não difere da soja amarela em função da cor da casca; possíveis variações são devidas às diferenças de cultivares, condições ambientais e de armazenamento (LIU, 1999; HA *et al*., 2009; PEREIRA, 2015).

O extrato de soja (base úmida) contém em geral 5,6-12% de sólidos totais, dependendo da razão soja/água utilizada no processamento, 2,6-4,5% de proteínas, 1,4-3,2% de óleo, 1,3-3,9% de carboidratos e 0,27-0,5% de cinzas (TANTEERATARM *et al*., 1999; LIU, 2008). Em geral, os dados de bebidas e extratos de soja são apresentados em base úmida. No entanto, para fins de comparação, a apresentação dos resultados em base seca é utilizada.

Em trabalho sobre bebida de soja e castanha-do-brasil, Felberg *et al*. (2009) obtiveram extrato de soja com composição comparável apenas para cinzas (5,4%). Os autores encontraram menor teor de proteínas (23,1%) e maior conteúdo de carboidratos (43,6%) e de lipídios (22,2%). Apesar da composição dos grãos de soja amarela em termos de macronutrientes ser similar ao do presente estudo, as diferenças observadas podem ser atribuídas

ao processamento uma vez que o extrato de soja preta foi obtido a partir do grão moído e o tamanho de partícula é um dos parâmetros de processamento que pode melhorar a extração de proteínas do grão para o meio aquoso (PREECE, HOOSHYAR, ZUIDAM, 2017). Considerando a apresentação dos dados em base seca, a alteração do teor de um ou mais componentes promoverá a redistribuição relativa dos demais.

A composição da okara apresentou um alto valor de carboidratos (61,0%), sendo na sua maioria fibras provenientes da casca, e quantidades apreciáveis de proteínas e lipídeos. Esse resultado está de acordo com dados de composição da okara reportados por Liu (2008), a saber: 25,4-28,4 % de proteína, 9,3-10,9 % de óleo, 40,2-43,6 % de fibra insolúvel, 12,6-14,6 % de fibra solúvel e 3,8-5,39 % de carboidratos.

5.3.1.2 Antocianinas no grão, EHSP e okara de soja preta

O processamento do extrato de soja preta apresentou grande influência sobre o teor de antocianinas totais no produto final e coproduto (

Figura 31). O extrato de soja preta apresentou 30% do valor de antocianinas presente no grão (33,5 mg/100g), enquanto a okara apresentou 25% do valor de antocianinas do grão (28,2 mg/100g). Fatores relacionados com o processamento da matriz podem afetar qualitativamente e quantitativamente a composição fenólica de uma variedade de produtos de origem vegetal (GRANATO, 2016). E, particularmente, o processamento térmico de alimentos pode influenciar diretamente os teores de antocianinas nos produtos finais (WANG *et al*., 2014).

Em relação ao perfil de antocianinas, a delfinidina-3-glicosídeo foi a antocianina que apresentou maior degradação não tendo sido detectada no EHSP, enquanto na okara seu valor foi de apenas 12% do conteúdo presente no grão. A cianidina-3-glicosídeo manteve-se como a antocianina majoritária apresentando conteúdo de 50% do teor do grão no EHSP e 34% na okara, ao passo que o teor de petunidina-3-glicosídeo foi de 23% do conteúdo presente no grão, tanto no EHSP quanto na okara.

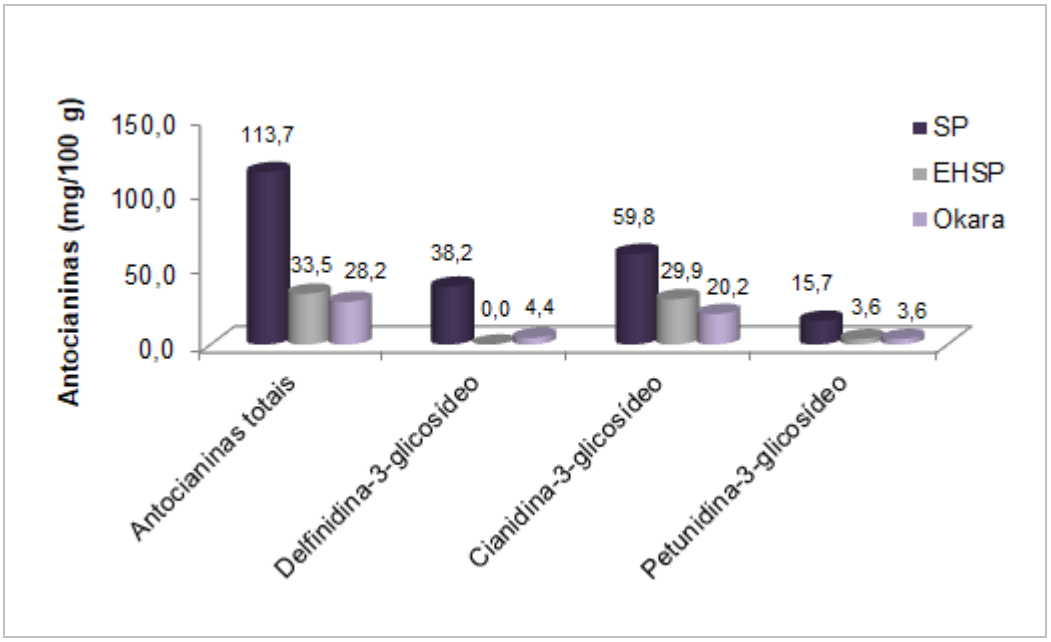


Figura 31. Antocianinas no grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta.

Conforme discutido no item 4.3.1, o perfil de antocianinas encontrado no grão de soja preta está de acordo com vários resultados que reportaram a composição de diferentes cultivares desse grão. O teor de antocianinas totais encontrado no grão utilizado nesta etapa do estudo foi de 113,7 mg/100g, enquanto no grão da safra anterior utilizado nos experimentos do Capítulo 4 foi de 92,15 mg/100g. Essa diferença entre safras encontrada corrobora com os dados da literatura sobre a variação dos metabólitos secundários em função das condições ambientais (HA *et al*., 2009; WU *et al*., 2017).

Era esperado que a okara apresentasse antocianinas na sua composição, pois esses compostos estão presentes na casca do grão (KIM *et al*., 2015) que, juntamente com outras substâncias insolúveis, compõem a okara (VONG e LIU, 2016). Contudo, não foram encontrados trabalhos que caracterizassem o perfil e conteúdo de antocianinas em okara de soja preta para enriquecer a discussão.

5.3.1.3 Isoflavonas no grão, EHSP e okara de soja preta

O perfil de isoflavonas encontrado no grão, extrato e okara foi predominantemente de daidzina, glicitina e genistina, contendo apenas traços das formas agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) (Figura 32). De fato a maior parte das isoflavonas existe na natureza como formas glicosiladas (LIU, 2008; CHENG *et al.,* 2011).

Quanto aos teores de isoflavonas totais (em base seca), o teor quantificado no extrato (EHSP) foi maior ($p < 0,05$) que no grão (SP) (Figura 32). Ocorre que o extrato é formado principalmente por compostos provenientes do cotilédone (proteínas e lipídios), enquanto a okara, coproduto da obtenção do extrato, contém cerca de 60% dos carboidratos, provenientes da casca principalmente. As isoflavonas são um grupo de flavonoides encontrados mais abundantemente em cotilédones e hipocótilos de soja (KUO *et al*., 2006), o que pode explicar os resultados obtidos neste estudo.

Considerando que a okara é um material rico em fibras, ainda com apreciável conteúdo de proteínas e óleo (LIU, 2008; ALI, 2010) e que parte das isoflavonas encontra-se associada às proteínas da soja (MURPHY, 2008), a okara também pode ser considerada uma boa fonte de isoflavonas.

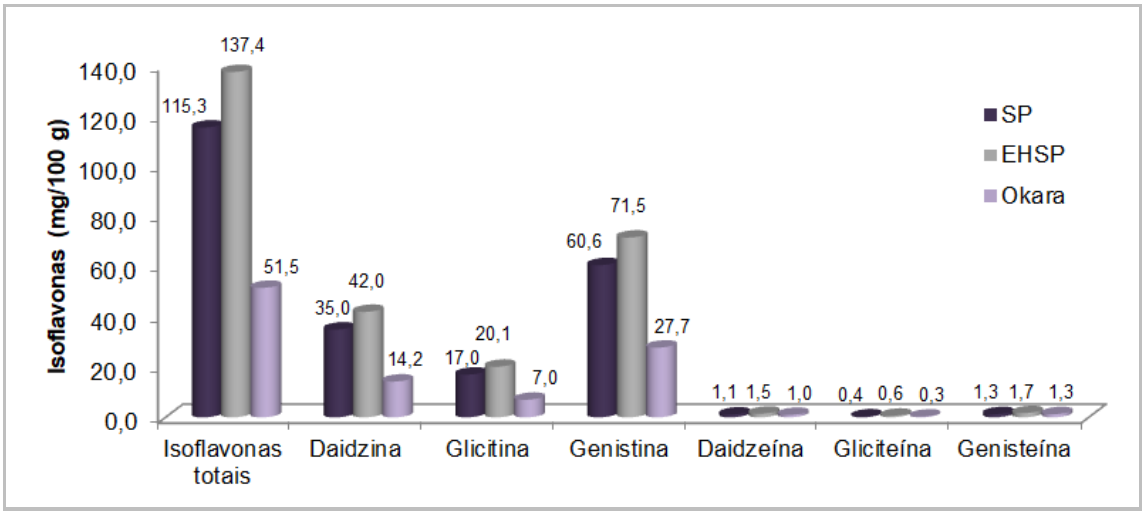


Figura 32. Isoflavonas no grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta (base seca).

Os valores de isoflavonas encontrados para o grão, extrato e okara estão de acordo com dados preconizados na literatura. Conforme discutido no item 4.3.1.3, os teores de isoflavonas nos grãos de soja preta são bem variados, tendo sido encontrados valores de 43,8 a 390 mg/100 g em função da cultivar e condições ambientais (KUMAR *et al*., 2010; JENG *et al*., 2010; CHO *et al*., 2013; LEE *et al*., 2016).

Comparativamente ao teor encontrado no EHSP (137,4 mg/100g), Xu e Chang (2009) obtiveram 114,4 mg/100 g de isoflavonas no extrato de soja preta, enquanto De Morais Filho *et al*. (2014) quantificaram 109 mg/100 g de isoflavonas no extrato de soja preta estudado. Esses últimos autores também encontraram conteúdo de isoflavonas maior no extrato (109 mg/100g, base seca) do que no grão de soja preta (83 mg/100g, base seca), tendo realizado processamento semelhante ao utilizado no presente trabalho.

Não foram encontrados estudos com okara de soja preta; contudo os valores de isoflavonas na okara não são dependentes da cor da casca, podendo ser comparados com dados da literatura para okara de soja amarela. Vong e Liu (2016) reportaram um teor médio de 35,7 mg de isoflavonas em 100 g de okara (base seca). Contudo, as informações disponíveis a respeito do conteúdo de isoflavonas na okara são, geralmente, expressas em percentual transferido do grão para o coproduto da obtenção do extrato. Jackson *et al*. (2002) estimaram o total de isoflavonas perdidos na okara em 31%, enquanto Wang e Murphy (1996) quantificaram o total de isoflavonas na okara como sendo 26% do conteúdo inicial presente no grão.

Para possibilitar a comparação do teor de isoflavonas na okara com as informações da literatura foi realizado um cálculo considerando os rendimentos em etapas do processo de obtenção do extrato de soja (Tabela 10). A okara foi formada por 24% dos sólidos dos grãos e seu teor de isoflavonas foi de aproximadamente 11% do conteúdo inicial do grão. Esse teor é menor que o reportado por Jackson *et al*. (2002) e Wang e Murphy (1996), possivelmente devido a diferenças no processamento como, por exemplo, a utilização de grãos moídos favorecendo a extração de proteínas e isoflavonas para o EHSP.

Tabela 10. Rendimento, umidade e teor de isoflavonas do grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta

	Rendimento (g)	Umidade(%)	Isoflavonas (mg/100g)
SP	250,0	8,0	115,2
EHSP	2300,0	93,0	137,4
Okara	220,0	75,0	51,5

5.3.1.4 Estimativa da atividade antioxidante na soja, EHSP e okara de soja preta

A atividade antioxidante estimada por ORAC foi expressa em Quercetina equivalente (QE) e em Trolox equivalente (TE), em ambos os casos, maiores valores são atribuídos a maiores atividades. Tanto para a concentração estimada em QE quanto em TE, as amostras SP e EHSP não diferiram entre si ($p \leq 0,05$), mas apresentaram maior valor de ORAC que a okara e, consequentemente, maior atividade antioxidante (

Tabela 11).

Tabela 11. Atividade antioxidante pelo método ORAC do grão (SP), extrato (EHSP) e okara de soja preta

Amostras	ORAC (µmol QE/g)	ORAC (µmol TE/g)
SP	36,44 [a] ± 2,26	156,15 [a] ± 9,67
EHSP	35,91 [a] ± 1,46	156,40 [a] ± 1,45
Okara	29,58 [b] ± 0,27	126,78 [b] ± 1,16

*Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$).

Os valores determinados de ORAC para o grão de soja preta estão de acordo com os valores encontrados por Slavin, Kenworthy e Yu (2009) para cinco diferentes cultivares de soja preta (75,0 a 250,0 µmol TE/g) e por Zhang *et al*. (2011) para 60 cultivares chinesas de soja preta (42,5 a 1834,6 µmol TE/g).

Xu e Chang (2009) encontraram valores de ORAC para extrato de soja preta de 55,09 µmol TE/g *in natura* e 42,76 µmol TE/g para o mesmo extrato submetido a tratamento térmico (100°C por 20 min).

A okara apresentou menor atividade antioxidante, estimada pelo método ORAC, quando comparada ao grão e ao EHSP. Esse comportamento era esperado devido ao menor conteúdo relativo de antocianinas e isoflavonas quantificados nesse material. O mesmo desempenho da okara foi identificado no trabalhado realizado por Tan *et al*. (2016), no qual a okara apresentou menores valores de ORAC que extratos de soja preta *in natura* e extratos de soja tratados termicamente, obtidos por diferentes processamentos.

Diferentemente do método ORAC, a atividade antioxidante estimada pelo método DPPH foi expressa em EC50, medida cujo menor valor indica uma maior atividade antioxidante.

O EHSP exibiu maior atividade antioxidante que o grão de soja preta (SP) como verificado pelo valor mais baixo de EC50 (Tabela 12). Esse mesmo comportamento foi observado no Capítulo 4. Esse aumento da atividade antioxidante, medido pelo método DPPH, do extrato processado pode ser explicado pelo maior teor de isoflavonas no extrato em relação ao grão e também devido à possível formação de novos compostos com novas propriedades antioxidantes ou a transformações ocorridas entre compostos originalmente existentes, conforme reportado por Xu e Chang (2009). Como discutido no item 4.3.2.3, esses mesmos autores (XU e CHANG, 2009) verificaram correlação positiva entre isoflavonas e DPPH.

Tabela 12. Atividade antioxidante pelo método DPPH do grão (SP) e extrato (EHSP) de soja preta

Amostras	DPPH (EC50) (mg/L)
SP	1,56[a] ± 0,24
EHSP	0,58[b] ± 0,02

*Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$).

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura com valores de DPPH expressos como EC50 para grãos de soja preta. Zhang *et al*. (2011) avaliaram a atividade antioxidante de 60 cultivares de soja preta e encontraram valores de EC50 variando de 0,048 mg/L a 0,65 mg/L, sendo esses valores menores que o valor encontrado para o grão de soja preta (SP) utilizado nesse experimento (Tabela 12). Não foram encontrados valores de expressos em EC50 na literatura para extrato de soja preta.

5.3.2 Avaliação do efeito do processo de fermentação e caracterização do produto fermentado durante período de armazenamento

5.3.2.1 Composição centesimal do EHSP antes e depois da fermentação

A composição do extrato de soja preta sofreu pequenas modificações após o processo de fermentação (Tabela 13). Ocorreu uma redução no teor de carboidratos e um aumento relativo de lipídios ($p \leq 0,05$). Proteínas e cinzas não apresentaram diferenças significativas. A redução de carboidratos era esperada no processo de fermentação uma vez que os microrganismos os utilizam como fonte de energia para o seu metabolismo (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Tabela 13. Composição centesimal do EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm)

Componente	Média ± DP** (g/100g), em base seca	
	EHSP	EHSP ferm
Proteínas	49,42[a] ± 0,17	50,22[a] ± 0,56
Carboidratos	27,40[a] ± 0,17	23,82[b] ± 0,64
Cinzas	5,84[a] ± 0,01	5,85[a] ± 0,05
Lipídios	17,35[a] ± 0,01	20,11[b] ± 0,13

*Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$). DP** = desvio padrão

As alterações observadas na composição centesimal antes e após a fermentação do extrato de soja preta também foram reportadas nos poucos

trabalhos encontrados na literatura, embora grandes diferenças tenham sido observadas nos valores descritos. Como já mencionado anteriormente, diferenças na composição centesimal de bebidas de soja são geralmente função da cultivar e diferenças mais acentuadas podem ser devido ao processamento e adição de ingredientes coadjuvantes.

Lee *et al*. (2015) encontraram para bebida de soja preta antes e após fermentação com *L. acidophilus* os teores de 21,28% e 22,22% de proteína, 62,31% e 59,26% de carboidratos, 12,46% e 12,04% de cinzas, e 3,95% e 6,48% de lipídios. Enquanto que Hong *et al*. (2012) descreveram conteúdos de proteínas (12,94% e 16,25%), carboidratos (53,1% e 46,65%), cinzas (5,2% e 5,5%), e de lipídios (28,46% e 31,90%) antes e após a fermentação com *L. acidophilus*, respectivamente.

Os estudos com bebidas fermentadas de soja são geralmente realizados a partir de soja amarela. Trindade *et al*. (2001) caracterizaram extrato de soja amarela fermentado com *S. termophilus* e *L. bulgaricus*, sem adição de carboidratos ou quaisquer aditivos, e quantificaram teores bem próximos aos obtidos neste estudo, sendo 47,73 g/100g de proteínas, 17,05 g/100g de carboidratos, 5,68 g/100 g de cinzas e 29,55 g/100g de extrato etéreo, apesar da diferença de cultivares utilizadas, do processo de obtenção do extrato, bem como do teor inicial de sólidos dos extratos.

Outros estudos foram encontrados na literatura reportando a composição centesimal de bebida fermentada de soja amarela, no entanto com adição de açúcares e/ou outros ingredientes.

Carneiro (2015) avaliou a composição centesimal de bebida fermentada de soja amarela obtida a partir da fermentação de extrato de soja, adicionado de 6,0% (m/m) de sacarose, com *L. acidophilus*. A composição, em base seca, da bebida fermentada foi 19,32 g/100g de proteínas, 71,64 g/100g de carboidratos, 5,18 g/100 g de cinzas e 3,86 g/100g de extrato etéreo. As diferenças de composição entre a bebida fermentada obtida por Carneiro (2015) e o extrato fermentado de soja preta obtido neste estudo podem ser atribuídas às diferenças nos processos de obtenção, mas principalmente pela adição de sacarose ao extrato de soja amarela.

Também Miguel *et al*. (2010) desenvolveram uma bebida fermentada de soja amarela utilizando extrato de soja desengordurado adicionado de 4,5% (m/v) de maltodextrina e cultura mista de *S. termophilus* e *L. bulgaricus*. Depois da fermentação, o produto foi adicionado de 6,0% de polpa de morango (80% fruta e 20% açúcar refinado). A bebida final apresentou 25,52 g/100 g de proteínas, 66,90 g/100 g de carboidratos, 4,01 g/100 g de cinzas e 0,32 g/100 g de extrato etéreo.

5.3.2.2 *Análise de açúcares*

Foi possível observar uma redução no teor de carboidratos (Tabela 14), no extrato fermentado indicando o seu consumo durante a fermentação. De fato, o consumo de açúcares fermentáveis era esperado, pois é uma característica do processo de fermentação lática (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Apesar de não terem sido encontrados estudos a respeito do consumo de açúcares durante o processo de fermentação de extrato de soja preta, diversos trabalhos com bebidas fermentadas de soja amarela reportaram esse comportamento.

Para a cultura utilizada, a sacarose foi a fonte de carbono preferencial apresentando redução significativa ($p < 0,05$) durante o período de armazenamento estudado de 28 dias (Tabela 14). Esse resultado corrobora com os de Pithong *et al*. (1980) que mostraram que *L. acidophilus* cresce bem no extrato de soja amarela devido à utilização eficiente da sacarose.

Rafinose e estaquiose também foram consumidos, mostrando a capacidade do *L. acidophillus* de fermentar também esses açúcares (Tabela 14). A rafinose apresentou uma redução significativa entre o EHSP e o EHSP ferm no tempo inicial (t=0), mas manteve-se estável durante o período de armazenamento, enquanto a estaquiose teve uma redução significativa durante todo o período de armazenamento estudado. Esse comportamento está de acordo com os resultados reportados por Mital e Steinkraus (1975) e por Wang *et al*. (2003) segundo os quais culturas de *L. acidophilus* são capazes de metabolizar estaquiose e rafinose.

Tabela 14. Teores de açúcares no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento

Açúcares	Média ± DP** (g/100g), em base seca			
	EHSP	EHSP ferm t=0	EHSP ferm t=14	EHSP ferm t=28
Sacarose	7,14[a] ± 0,06	0,97[b] ± 0,01	0,61[c] ± 0,01	0,30[d] ± 0,01
Rafinose	1,42[a] ± 0,01	0,69[b] ± 0,01	0,71[b] ± 0,01	0,70[b] ± 0,01
Estaquiose	5,57[a] ± 0,01	5,16[b] ± 0,03	4,74[c] ± 0,01	4,27[d] ± 0,02
Sacarose + rafinose + estaquiose	14,13[a] ± 0,06	6,83[b] ± 0,05	6,06[c] ± 0,01	5,27[d] ± 0,03

*Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$). DP** = desvio padrão.

Assim como no caso deste trabalho, Wang *et al*. (2003) verificaram a redução significativa dos três açúcares estudados em extrato de soja amarela utilizando cultura pura de *L.acidophilus*, porém com valores percentuais bem distintos. Os conteúdos de sacarose, rafinose e estaquiose foram reduzidos em 17,7%, 9,2% e 31%, respectivamente, no extrato após 24 horas de fermentação a 37 °C.

Na Figura 33, pode ser observada a tendência do consumo de cada carboidrato avaliado durante a fermentação e ao longo do período de armazenamento estudado. A curva da sacarose é muito semelhante à de açúcares totais uma vez que foi a fonte de carbono mais abundante e preferencialmente metabolizada pela cultura probiótica; rafinose e estaquiose apresentaram variações mais discretas.

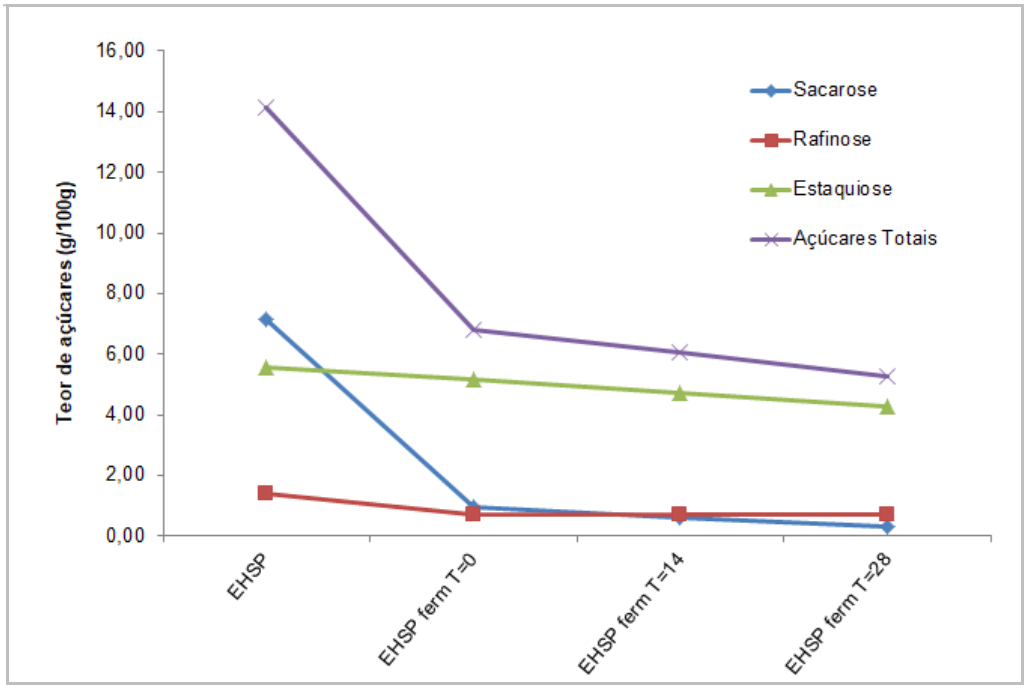


Figura 33. Consumo de açúcares durante a fermentação e período de armazenamento de 28 dias.

Diferentes matérias-primas e culturas microbianas resultam em diferentes comportamentos durante o processo de fermentação (TAKAGI, KANO e KAGA, 2015). Hou, Yu e Chou (2000) avaliaram a mudança nos teores de açúcares de extrato de soja amarela fermentado com *Bifidobacterium infantis* e de extrato fermentado com *B. longum* e, assim como no presente trabalho, observaram o consumo de sacarose, rafinose e estaquiose. Contudo, diferentemente do presente estudo onde sacarose foi destacadamente a principal fonte de carbono utilizada seguida de rafinose e estaquiose, para os extratos fermentados com *B. infantis* e *B. longum*, *a* estaquiose seguida de rafinose apresentaram maior magnitude de redução durante a fermentação.

5.3.2.2 Determinação de pH, acidez e determinação de células probióticas viáveis de L. acidophilus

Assim como o consumo dos açúcares (Tabela 14), o decréscimo do pH e o aumento da acidez titulável (Tabela 15) ocorreram na bebida fermentada

como é característico do processo de fermentação (TRINDADE *et al*., 2001; ESTEVES, 2011). Após 4 horas de fermentação, o pH do extrato diminuiu de 6,46 para 4,50 e a acidez total aumentou de 0,10 % para 0,44 %, tendo se mantido estável durante o período de armazenamento estudado e indicando baixa pós-acidificação do produto.

Em relação a células probióticas viáveis, no tempo t=0 após a fermentação houve uma alta contagem de *Lactobacillus spp*. seguida de redução na contagem durante o período de armazenamento, passando inicialmente de 10^7 a 10^5 UFC/mL no final do estudo.

Tabela 15. Características de acidez e concentração da cultura probiótica pela fermentação do EHSP durante 28 dias de armazenamento

Amostra	pH	Acidez total em ác. lático (g/100g)	*Lactobacillus spp*.(UFC/mL)	*Lactobacillus spp*. (UFC/porção de 200 mL)
EHSP	6,46	0,10	ND*	ND*
EHSP ferm t=0	4,50	0,44	$7,30 \times 10^7$	$1,46 \times 10^{10}$
EHSP ferm t=14	4,56	0,44	$4,80 \times 10^6$	$9,6 \times 10^8$
EHSP ferm t=28	4,59	0,44	$2,20 \times 10^5$	$4,40 \times 10^7$

ND* = não determinado

Lee *et al*. (2015) avaliaram a fermentação de extrato de soja preta com diferentes bactérias láticas (*L. acidophilus*, *L. plantarun* ou *S. thermophilus*) e verificaram aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem de células viáveis para todas as amostras de extrato do soja preta durante a fermentação a 37 °C durante 24 h, em comparação com os controles não fermentados. A contagem inicial de bactérias láticas foi em média 10^7 UFC/mL e atingiu 10^8-10^9 UFC/mL após 24 h de fermentação. O valor de pH diminuiu de 6,05-6,28 para 4,15 e a acidez titulável aumentou de 0,10-0,11% para 0,61-0,65% após 24 horas de fermentação do extrato devido ao crescimento das culturas utilizadas com consequente produção de ácido lático.

Em relação ao período de armazenamento, Rinaldoni, Campderrós e Padilla (2012) não observaram variações significativas ($p < 0,05$) nos valores

de pH e acidez de bebidas fermentadas de soja amarela avaliadas ao longo de 21 dias.

Comparando com bebidas lácteas, Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) avaliaram a viabilidade da cultura mista de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* em bebida láctea fermentada e reportaram a redução de 1 ciclo logarítmico na contagem de bactérias láticas ao longo de 21 dias de armazenamento, com redução de 10^8 UFC/mL para 10^7 UFC/mL.

A viabilidade dos microrganismos probióticos em produtos lácteos fermentados pode ser afetada por diversos fatores, entre eles a cepa, a pós-acidificação, a composição da co-cultura e a presença de fatores de crescimento presentes na matriz. Do mesmo modo, baixos valores de pH inibem o metabolismo e, consequentemente, o crescimento de *L. acidophilus*, sendo nocivos para as células bacterianas, reduzindo sua viabilidade (OLIVEIRA *et al*.,2002). Considerando que no presente estudo não foi observada pós-acidificação e foi utilizada cultura pura de *L. acidophilus*, não existindo, portanto, co-cultura que afetasse a sua viabilidade, possivelmente a interrupção da fermentação em um valor de pH maior (4,9-4,8) poderia favorecer a manutenção da cultura probiótica utilizada durante o período de armazenamento de 28 dias.

A legislação brasileira define probióticos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Em 2008, houve uma atualização da lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Dentre os probióticos aprovados para alimentos estava o *Lactobacillus acidophilus* e como requisito para a utilização da alegação “O (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”, a quantidade mínima viável para os probióticos deveria estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Em 2016, a ANVISA atualizou a Legislação sobre “Alimentos Com Alegações de

Propriedades Funcionais e ou de Saúde", e valores menores podem ser aceitos, desde que comprovada sua eficácia (BRASIL, 2016).

Sendo adotado o valor de porção de 200 mL de produto, indicado para leites fermentados (BRASIL, 2003), o EHSP fermentado apresentou-se em conformidade com a legislação durante pelo menos 14 dias de armazenamento. Aos 28 dias, apresentou contagem com uma ordem de grandeza menor que o preconizado devendo, portanto, ser estudado o intervalo de 14 a 28 dias de armazenamento para definir com maior precisão o período de viabilidade dos probióticos em contagem necessária a alegação no rótulo.

5.3.2.3 Análise de antocianinas

Na Tabela 16, estão apresentados os resultados obtidos para antocianinas no EHSP recém-processado e nos extratos fermentados durante 28 dias de armazenamento.

Tabela 16. Antocianinas presentes no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento

Antocianinas	Média ± DP** (mg/100g), em base seca			
	EHSP	EHSP ferm t = 0	EHSP ferm t = 14	EHSP ferm t = 28
Delfinidina-3-glicosídeo	ND*	ND*	ND*	ND*
Cianidina-3-glicosídeo	$29,94^{a}$ ± 1,59	$23,26^{b}$ ± 0,19	$20,19^{c}$ ± 0,25	$19,10^{c}$ ± 0,49
Petunidina-3-glicosídeo	$3,61^{a}$ ± 0,14	$3,62^{a}$ ± 0,02	$2,78^{b}$ ± 0,28	$1,95^{c}$ ± 0,19
Antocianinas totais	$33,55^{a}$ ± 1,73	$26,88^{b}$ ± 0,21	$22,97^{c}$ ± 0,53	$21,05^{c}$ ± 0,30

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$).ND* = não determinado; **DP = desvio padrão.

O conteúdo de antocianinas totais do EHSP apresentou redução significativa ($p \leq 0,05$) após a fermentação e durante o tempo de armazenamento de 14 dias, a partir do qual permaneceu estável até o período estudado de 28 dias (Figura 34). O mesmo comportamento foi observado para

a antocianina majoritária, cianidina-3-glicosídeo, enquanto que para a petunidina-3-glicosídeo não foi observada redução no teor de antocianinas do EHSP para o EHSP ferm t=1, mas houve perda significativa ($p \leq 0,05$) durante o período de armazenamento avaliado. Diferentemente do perfil apresentado pelo grão de soja preta (item 5.3.1.2), a delfinidina-3-glicosídeo não foi detectada no EHSP antes ou após a fermentação, tendo sido provavelmente degradada durante o processo de obtenção do extrato.

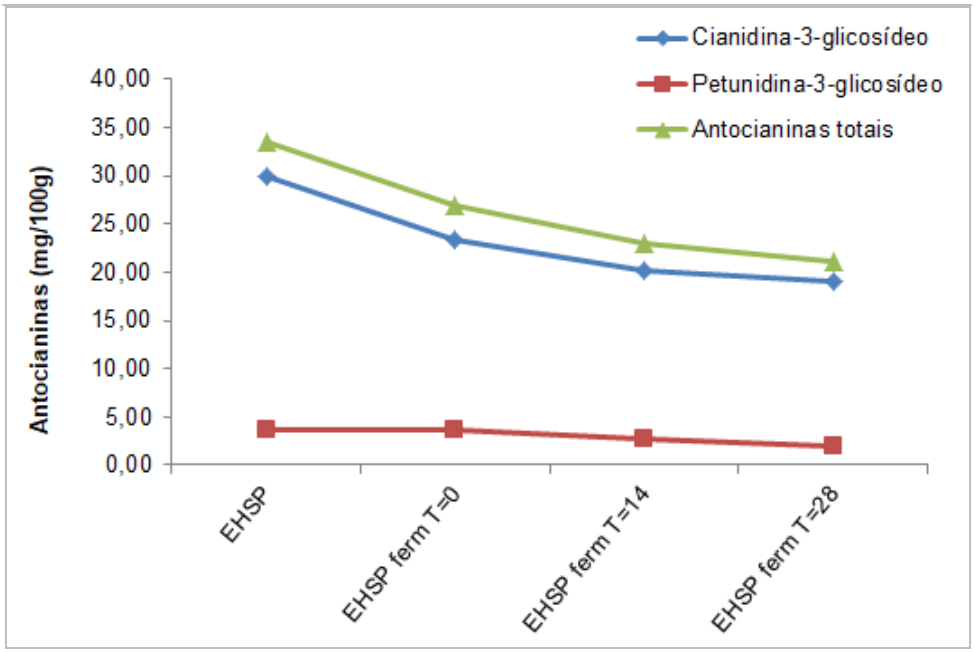


Figura 34. Antocianinas presentes no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento.

Considerando o comportamento das antocianinas frente à fermentação do extrato de soja preta com bactérias láticas, o único trabalho encontrado foi realizado por De Moraes Filho *et al*. (2014). Os autores obtiveram queijo *quark* a partir da fermentação do extrato de soja preta com cultura mista de *L. acidophilus*, *B. Lactis*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. No entando, as antocianinas foram quantificadas somente para o produto final após sinérese, não sendo possível determinar a perda de antocianinas atribuída exclusivamente ao processo de fermentação, uma vez que grande parte desses compostos possivelmente foi perdida no soro.

Também outros alimentos ricos em antocianinas apresentaram redução nos seus teores quando submetidos ao processo de fermentação. Nie *et al*. (2017) investigaram o impacto da fermentação (*Lactobacillus*, 37°C por 40 h) sobre o conteúdo total de antocianinas em purê de mirtilo e observaram uma redução de 29% no conteúdo total de antocianinas quando comparado ao mirtilo fresco. Wiczkowski, Szawara-Nowak e Topolska (2015) verificaram redução de 24% no conteúdo de antocianinas de repolho roxo após o processo de fermentação. Mesmo comportamento foi reportado por Lan *et al.* (2017) que atribuíram a redução dos teores de antocianinas às reações e interações de polimerização e degradação entre esses e outros compostos fenólicos durante o processo de obtenção de bebida fermentada de romã.

5.3.2.4 Análise de isoflavonas

A tabela 17 apresenta o perfil e o teor de isoflavonas presentes no extrato de soja preta não fermentado (EHSP) e no extrato fermentado (EHSP ferm) logo após a fermentação (t=0) e nos tempos 14 (t=14) e 28 (t=28) dias de armazenamento.

A alteração do perfil de isoflavonas ocorreu no extrato fermentado em função da fermentação, contudo não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teor de isoflavonas totais entre a amostra não fermentada e a amostra fermentada, durante o tempo de armazenamento estudado (Figura 35-D).

A fermentação promoveu a hidrólise das frações glicosídicas das isoflavonas convertendo parte delas em agliconas. Esse efeito foi observado com maior amplitude na conversão de genistina em genisteína (Figura 35-C). Esse comportamento é amplamente relatado em trabalhos com alimentos fermentados de soja (WU e CHOU, 2009; CHENG *et al*., 2011; LEE *et al*., 2015). De acordo com Lee *et al*. (2015), o efeito da fermentação sobre as isoflavonas deve-se à capacidade de alguns microrganismos de produzir β-glicosidases e promover a hidrólise das isoflavonas glicosídicas durante o processo de fermentação.

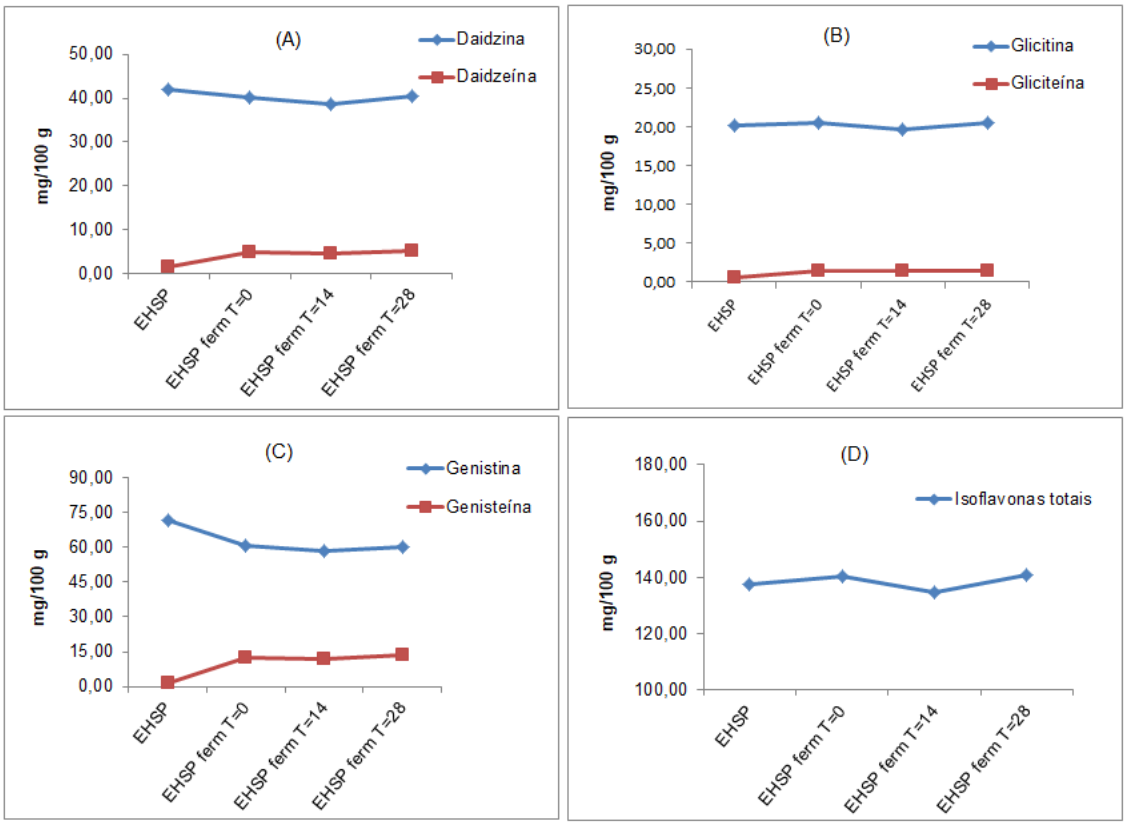


Figura 35. Isoflavonas presentes no EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento.

Tabela 177. Isoflavonas presentes no EHSP e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento

Isoflavona	Média ± DP** (mg/100g), em base seca			
	EHSP	EHSP ferm t=0	EHSP ferm t=14	EHSP ferm t=28
Daidzina	41,95[a] ± 0,50	40,27[a] ± 1,19	38,72[a] ± 2,42	40,33[a] ± 0,50
Glicitina	20,14[a] ± 0,23	20,52[a] ± 0,58	19,61[a] ± 1,28	20,48[a] ± 0,25
Genistina	71,52[a] ± 0,56	60,84[b] ± 0,87	58,40[b] ± 2,39	59,91[b] ± 0,71
Daidzeína	1,46[a] ± 0,02	4,78[b] ± 0,35	4,59[b] ± 0,44	5,11[b] ± 0,02
Gliciteína	0,63[a] ± 0,05	1,45[b] ± 0,05	1,40[b] ± 0,12	1,52[b] ± 0,00
Genisteína	1,69[a] ± 0,00	12,68[b] ± 1,09	12,16[b] ± 1,23	13,45[b] ± 0,14
Isoflavonas Totais	137,39[a] ± 1,35	140,53[a] ± 4,14	134,86[a] ± 7,89	140,81[a] ± 1,61

*Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$). **DP = desvio padrão.

Hong *et al.* (2012) avaliaram o aumento do conteúdo de isoflavonas agliconas em bebida de soja preta fermentada com *L. acidophilus* e verificaram que, em 12 horas de fermentação a 37°C, o teor das isoflavonas glicosídicas daidizina e genistina reduziram de 2,85 para 0,13 mg/100g e de 1,85 para 0,67 mg/100g, respectivamente. Por outro lado, o teor das isoflavonas agliconas correspondentes, daidzeína e genisteína, aumentou de 0,27 para 0,89 mg/100g e de 0,51 para 3,45 mg/100g, respectivamente.

Lee *et al*. (2015) também verificaram a conversão de isoflavonas glicosídicas em aglicona durante a fermentação de bebida de soja preta com *L. acidophilus*. Os autores encontraram que os valores de daidzina e genistina reduziram de 149,04 para 3,10 mg/100g e de 169,84 para 5,93 mg/100g, respectivamente, enquanto os conteúdos de daidzeína e genisteína aumentaram de 4,99 para 105,20 mg/100g e de 7,84 para 181,06 mg/100g, respectivamente, no extrato de soja preta fermentado durante 12 h a 37°C.

As agliconas são as formas biologicamente ativas no organismo e estudos têm revelado que essas formas são absorvidas mais rapidamente e em maiores quantidades que seus glicosídeos, sendo que as isoflavonas glicosídicas são convertidas em agliconas no organismo tanto pela ação das β-glicosidases da mucosa intestinal, quanto da microbiota (ISMAIL e HAYES, 2005; CHEN *et al*., 2012, LEE *et al*., 2015). Portanto, o aumento das formas agliconas no EHSP fermentado pode ser considerado como um benefício decorrente do processo de fermentação ao qual o extrato foi submetido.

5.3.2.5 Estimativa da atividade antioxidante

Foi observado um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da atividade antioxidante, estimada pelo método DPPH, para o extrato de soja preta após o processo de fermentação com *L. acidophilus* (Tabela 18).

A amostra de EHSP recém-processado apresentou valor de EC50 maior que a amostra de EHSP ferm ($p \leq 0,05$), a qual não diferiu durante o período de armazenamento. Sendo o valor de DPPH expresso em EC50, quantidade de amostra para reduzir a concentração de DPPH em 50%; quanto menor o valor de EC50 maior a atividade antioxidante exercida pela amostra.

Tabela 18. Atividade antioxidante pelo método DPPH do EHSP e do EHSP ferm durante 28 dias de armazenamento

Amostra	DPPH (EC50) ± DP** (mg/L)
EHSP	0,58[a] ± 0,02
EHSP ferm T=0	0,28[b] ± 0,07
EHSP ferm T=14	0,22[b] ± 0,04
EHSP ferm T=28	0,18[b] ± 0,03

*Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$). **DP = desvio padrão.

Na Figura 36, é possível visualizar a tendência de comportamento da atividade antioxidante do extrato de soja preta, estimada por DPPH, durante o processo de fermentação e período de armazenamento do produto fermentado.

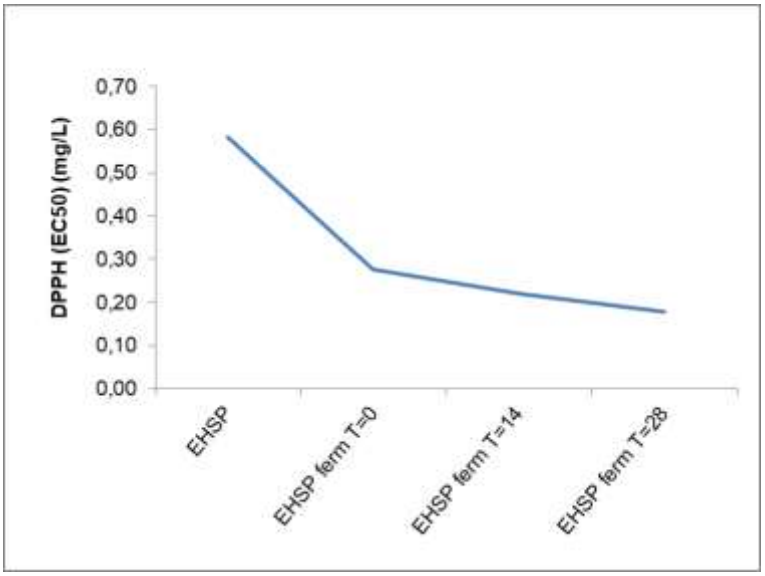


Figura 36. Atividade antioxidante pelo método DPPH do EHSP antes e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento.

Lee *et al.* (2015) também verificaram maior atividade antioxidante, estimada pelo método DPPH, no extrato de soja preta fermentado com *L. acidophilus* comparado ao controle não fermentado.

A atividade antioxidante por DPPH foi avaliada por Chun *et al*. (2008) para extratos fermentados de soja amarela (SA) e soja preta (SP) em diferentes proporções (SA:SP = 100:0, 70:30, 50:50 e 100:0, v/v) e foi observado um acréscimo significativo ($p \leq 0,05$) da atividade antioxidante à medida que a porcentagem de soja preta na bebida fermentada aumentou.

No trabalho desenvolvido por Pyo *et al*. (2005), foi demonstrado que o aumento da atividade antioxidante pelo método DPPH para um produto de soja fermentado com bactérias láticas apresenta correlação com uma maior concentração de isoflavonas agliconas convertidas durante o processo fermentativo. Além disso, as proteínas de soja e os polifenóis menos biodisponíveis na forma *in natura* podem ser convertidos em formas mais biodisponíveis pela fermentação, resultando em produtos com maior atividade antioxidante (SANJUKTA, RAI e SAHOO, 2017).

Outro método comumente utilizado para estimar a atividade antioxidante em alimentos é o ORAC. No presente estudo não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) para os valores de ORAC entre o EHSP não fermentado recém-processado e de EHSP fermentado nos tempos t=14 e t=28. Apesar da aparente redução da atividade antioxidante logo após a fermentação (EHSP ferm t=0) este resultado não representou a tendência de comportamento confirmada pelos pontos seguintes (EHSP ferm t=14 e t=28) (Tabela 19).

Tabela 19. Atividade antioxidante pelo método ORAC do EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento

Amostra	ORAC ± DP** (µmol QE/g)	ORAC ± DP** (µmol TE/g)
EHSP	$35,91^{a}$ ± 1,46	$156,40^{a}$ ± 1,45
EHSP ferm t=0	$31,80^{b}$ ± 0,06	$139,07^{b}$ ± 4,17
EHSP ferm t=14	$36,78^{a}$ ± 1,48	$156,48^{a}$ ± 4,73
EHSP ferm t=28	$34,28^{ab}$ ± 0,45	$150,51^{a}$ ± 2,49

*Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$). **DP = desvio padrão.

Não foram encontrados resultados de estimativa de capacidade antioxidante avaliada por ORAC para bebidas fermentadas de soja preta na literatura. Embora tenha sido observada uma redução no conteúdo de antocianinas durante a fermentação do EHSP, a atividade antioxidante entre o EHSP e o EHSP fermentado foi mantida, possivelmente devido à conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas equilibrando a perda de atividade provocada pela diminuição das antocianinas.

5.3.3 Avaliação da inativação de fatores antinutricionais

A determinação da atividade ureática é uma medida usada pela indústria para avaliação da efetividade do tratamento térmico sobre os fatores antinutricionais, uma vez que a enzima urease apresenta resistência térmica similar aos principais fatores antinutricionais da soja, especialmente ao inibidor de tripsina (DE LIMA *et al*., 2011).

Conforme ilustrado na Tabela 20, a soja preta grão (SP) apresentou atividade ureática de 1,78, enquanto o EHSP e a Okara apresentaram valores de diferença de pH de 0,30 e 0,36, respectivamente. Valores de diferença de pH entre 0,02 a 0,30 indicam adequação do tratamento térmico aplicado ao produto de soja (PAULSEN, 2008, DE LIMA *et al*., 2011). Estes resultados indicam que o processamento do extrato de soja foi adequado para a redução de compostos antinutricionais, e não foi verificado alteração em função do processo fermentativo. Por outro lado, para utilização da okara como ingrediente deve ser aplicado tratamento térmico adicional.

Tabela 20. Atividade ureática do EHSP não fermentado e após a fermentação (EHSP ferm) durante 28 dias de armazenamento

Amostra	Atividade Ureática (Diferença entre pH)
SP	1,78
EHSP	0,30
SP Ferm t= 0	0,31
SP Ferm t=14	0,31
SP Ferm t=28	0,29
Okara	0,36

5.3.4 Aceitação sensorial de bebidas fermentadas de soja preta

A aceitabilidade do consumidor para as bebidas fermentadas de soja preta com diferentes sabores revelou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras avaliadas (Tabela 21). Os valores médios das bebidas fermentadas variaram de 5,6 (gostei ligeiramente) a 7,6 (gostei muito). A bebida fermentada formulada com preparado de fruta sabor morango apresentou em média, o valor mais elevado de aceitação (7,6), seguido da bebida sabor uva (7,0). A bebida adicionada apenas de açúcar (5,6) e a bebida sabor ameixa (5,9) não diferiram entre si ($p \leq 0,05$), apresentando os menores valores de aceitação entre as quatro bebidas avaliadas.

Tabela 21. Valores médios de aceitação[§] de bebidas fermentadas de soja preta com diferentes formulações

Bebida Fermentada de Soja Preta	Médias Estimadas
Adicionada apenas de açúcar	$5,6^{c}$
Sabor ameixa	$5,9^{c}$
Sabor morango	$7,6^{a}$
Sabor uva	$7,0^{b}$

§ Avaliada por escala hedônica de 9 pontos variando de 1: não gostei extremamente até 9: gostei extremamente. Diferentes letras em sobrescrito significam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0.05$) pelo teste de Fisher.

Chun *et al*. (2008) avaliaram a aceitação de bebidas fermentadas de soja preparadas a partir de extrato de soja amarela e preta, formuladas apenas com açúcar, com *Streptococcus infantarius* 12 e *Weisellia* sp.4. Os autores processaram o extrato de soja amarela a partir da soja descascada, enquanto o extrato de soja preta foi processado com a casca em função da presença das antocianinas. O extrato fermentado obtido a partir de 100% soja amarela apresentou a maior aceitabilidade (5,9) enquanto a bebida a partir de 100% soja preta teve a menor aceitação (5,2) em uma escala de 9 pontos. Conforme apresentado anteriormente (Tabela 21), a nota média de aceitação para a bebida fermentada adicionada apenas de açúcar foi de 5,6, valor intermediário

entre os obtidos no referido trabalho que comparou os extratos fermentados de soja preta e amarela.

Em seguida, a análise hierárquica de *cluster* foi utilizada para identificar consumidores com diferentes classificações de aceitação para as bebidas de soja. Para segmentação pela análise de *cluster*, foram revelados três segmentos de consumidores nos quais houve diferença ($p \leq 0,05$) de aceitação das amostras (Tabela 22).

Tabela 22. Valores médios de aceitação[§] de bebidas fermentadas de soja preta para cada um dos três subgrupos de preferências (*clusters*)

Bebida Fermentada de Soja Preta	Segmentos de consumidores		
	Cluster 1 (n = 30)	*Cluster* 2 (n = 33)	*Cluster* 3 (n = 40)
Adicionada apenas de açúcar	$4,1^{ef}$	$4,7^{e}$	$7,4^{abc}$
Sabor ameixa	$3,2^{f}$	$7,0^{bcd}$	$7,0^{bcd}$
Sabor morango	$6,4^{cd}$	$7,7^{ab}$	$8,3^{a}$
Sabor uva	$6,5^{cd}$	$6,0^{d}$	$8,2^{a}$

§ Avaliada por escala hedônica de 9 pontos variando de 1: não gostei extremamente até 9: gostei extremamente. Diferentes letras em sobrescrito significam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0.05$) pelo teste de Fisher.

Os consumidores do *cluster* 1 atribuíram as menores pontuações em geral para todas as amostras e em contrapartida, os consumidores do *cluster* 3 deram as maiores notas para todas as amostras.

A bebida fermentada de soja preta sabor morango foi a mais aceita em todos os 3 *clusters* formados, com pontuação que variou de 6,4 a 8,3 entre os segmentos. Os consumidores do *cluster* 1 preferiram igualmente as bebidas sabor morango e uva, seguidas pela bebida adicionada apenas de açúcar e sabor ameixa, que também não diferiram entre si quanto à aceitação dos consumidores desse segmento. Para o *cluster* 2, as bebidas sabor morango e ameixa foram igualmente aceitas com as maiores notas, seguidas da bebida sabor uva e por último pela bebida adicionada apenas de açúcar. Para o *cluster* 3, segmento com o maior número de consumidores com percepções afins, as bebidas sabor morango, uva e a adicionada apenas de açúcar não diferiram entre si quanto a sua aceitação e tiveram valores maiores que a amostra sabor ameixa.

Em relação à influência da frequência de consumo sobre a aceitação das amostras, observa-se que as maiores notas atribuídas às amostras de um modo geral refletem a periodicidade do consumo, ou seja, as maiores notas foram atribuídas aos consumidores com maior frequência de consumo (Tabela 23).

Tabela 233. Valores médios de aceitação[§] de bebidas fermentadas de soja preta em função da frequência de consumo de bebidas de soja pelos provadores

Bebida Fermentada de Soja Preta	Frequencia de consumo			
	Nunca (n = 19)	Raramente (n = 58)	Frequentemente (n = 24)	Diariamente (n = 2)
Adicionada apenas de açúcar	5,6 ^{cde}	5,3 ^{de}	6,0 ^{bcd}	8,0 ^{a}
Sabor ameixa	4,8^{e}	5,9^{cd}	6,7^{abc}	7,5^{a}
Sabor morango	6,7^{ab}	7,6^{a}	8,0^{a}	9,0^{a}
Sabor uva	7,0^{ab}	6,7^{ab}	7,5^{a}	8,5^{a}

Diferentes letras em sobrescrito significam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Fisher.

Considerando que a maioria dos consumidores (58 pessoas) consomem bebidas de soja raramente, ou seja, não possuem hábito de consumo desse tipo de produto, as médias das notas atribuídas por esse grupo para as bebidas fermentadas de soja preta com diferentes formulações variaram de 5,3 (adicionada apenas de açúcar) a 7,6 (sabor morango), o que pode ser considerado uma aceitação alta, especialmente para produtos de soja (Felberg *et al.*, 2010).

O processo de fermentação contribuiu com a melhoria das características sensoriais no produto elaborado a partir de soja preta, refletido globalmente na aceitação melhor das amostras fermentadas comparadas com a não fermentada apresentada no Capítulo 4. Estes resultados corroboram a afirmação de Jay (2005) de que o processo de fermentação em geral promove alterações sensoriais desejáveis de textura, aroma e sabor.

5.4 CONCLUSÕES

- ✓ O grão de soja preta BRM 09-50995 apresentou valores de composição centesimal, compostos bioativos (isoflavonas e antocianinas) e atividade antioxidante de acordo com as faixas de variação encontrada na literatura para soja preta.
- ✓ A composição do extrato de soja preta após a fermentação apresentou redução nos teores de carboidratos e aumento no teor de lipídios.
- ✓ O *L. acidophilus* foi capaz de fermentar o extrato de soja preta utilizando os oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) da soja como fonte de carbono, além da sacarose.
- ✓ Foi obtida uma bebida probiótica de soja preta com viabilidade mínima de probióticos de 10^8 UFC por porção de 200 mL durante 14 dias de armazenamento.
- ✓ Houve redução de 20% no teor de antocianinas do extrato de soja preta após a fermentação.
- ✓ O processo de fermentação promoveu a conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas, sem alteração do conteúdo total.
- ✓ A fermentação manteve ou melhorou a atividade antioxidante do extrato de soja preta desenvolvido.
- ✓ O processo de fermentação contribuiu para a melhor aceitação sensorial de bebidas de soja preta. Dentre os sabores estudados, a bebida sabor morango obteve a maior média de aceitação, correspondendo a “gostei muito” na escala de avaliação.
- ✓ A okara de soja preta apresentou características nutricionais e de compostos bioativos potencialmente favoráveis a sua utilização como ingrediente alimentício.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, N. (2010). Soybean processing and utilization. In: SINGH, G. (Ed.) The soybeans botany, production and uses. Cambridge, MA: CABI. p. 345-460, 2010.

American Public Health Association - APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington, p.676, 2001.

Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis. 18 ed., 3ª rev. Washington, DC, 2010.

BRASIL. 2003. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 dez. 2003.

BRASIL. 2017 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil) 2017. Probióticos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?_3_keywords=Probi%C3%B3ticos&_3_formDate=1441824476958&p_p_id=3&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&_3_groupId=0&_3_struts_action=%2Fsearch%2Fsearch&_3_cur=1&_3_format=&.x=0&.y=0>. Acesso em 17.09.2017.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC no 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção I, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC N.º 2, de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, Atualização. Brasília, DF, 2016. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>, acesso em 20/08/2017.

CARNEIRO, M. S. Processamento de bebidas de soja obtidas a partir do grão, da farinha e do extrato em pó e fermentadas por probióticos. 2015. 46p. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2015. 46p.

CHENG, K. C.; LIN, J. T.; LIU, W. H., Extracts from fermented black soybean milk exhibit antioxidant and cytotoxic activities. Food Technology and Biotechnology, v.49 n.1, p. 111-117, 2011.

CHO, K.M.; HA, T, J.; LEE, Y. B.; SEO, W. D.; KIM, J. Y.; RYU, H. W.; JEONG, S. H.; KANG, Y. M., LEE, J. H. Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (Glycine max L.) cultivars with varying seed coat colours. Journal of Functional Foods, v.5, p. 1065-1076, 2013.

CHUN, J.; KIM, J. S.; KIM, J. H. Enrichment of isoflavones aglycone in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weisellia* sp. 4. Food Chemistry, v.109, p. 278-284, 2008.

CHUN, J.; KNOW, D.-Y.; KIM, J. S.; KIM, J.-H. Sensory properties of soy yoghurts prepared from yellow and black soymilk using *Streptococcus infantarius* 12 and *Weisellia* sp. 4. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 88, p. 1845-1849, 2008.

DE LIMA, M. R.; MORAIS, S. A. N.; COSTA, F. G. P.; PINHEIRO, S. G.; DANTAS, L. S.; CAVALCANTE, L. E. Atividade Ureática. Revista Eletrônica Nutritime, artigo 145, v. 8, n. 5, p. 1606-1611, 2011.

DE MORAES FILHO, M. L., HIROZAWA, S. S., PRUDENCIO, S. H., IDA, E. I., GARCIA, S. Petit Suisse from black soybean: bioactive compounds and antioxidant properties during development process. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v.65, p.470-475, 2014.

ESTEVES, T. C. F. Desenvolvimento de alimento fermentado de soja tipo “iogurte”: avaliação da estabilidade física. 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011. 88p.

FELBERG, I.; DELIZA, R.; FARAH, A.; CALADO, V.; DONANGELO, C. M. Formulation of a soy-coffee beverage by response surfasse methodology and internal preference mapping. Journal of Sensory Studies, v. 25, p. 226-242, 2010.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; MACIEL, L. G.; NUNES, D. S. Chemical perspective and criticismo on selected analytical methods used to estimate the

total contente of phenolic compounds in food matrices. Trends in Analytical Chemistry, v. 80, p. 266-279, 2016.

HA, T. J.; LEE, J. H.; SHIN, S.-O.; SHIN, S.-H.; HAN, S.-I.; KIM, H.-T.; KO, J.-M.; LEE, M.-H.; PARK, K.-Y. Changes in anthocyanin and isoflavone concentrations in black seed-coated soybean at different planting locations. Journal of Crop Science and Biotechnology, v.12, n. 2, p.79-86, 2009.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2014, v.11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HONG, G. E.; MANDAL, P. K.; LIM, K. W.; LEE, C. H. Fermentation increases isoflavone aglycone contents in black soybean pulp. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, v.7, n. 6, p. 502-511, 2012.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3. ed. São Paulo, v.1, p.533, 1985.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. Fermented and non-fermented milk products: detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus. Bulletin of the IDF, n. 306, p. 23-33, 1995.

ISMAIL, B.; HAYES, K. beta-Glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. Journal of. Agricultural and. Food Chemistry, v. 53, n.12, p. 4918–4924, 2005.

JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. 2002.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. Porto Alegre: Artmed, 6ª ed. 712p. 2005.

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, n. 4, p. 1112-1116, 2010.

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. K.; PRATAP, D. BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. Food Research International, v.43, n.1, p.323-328, 2010.

KUO, L. C.; CHENG, W. Y.; WU, R. Y.; HUANG, C. J.; LEE, K. T. Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by Bacillus subtilis natto. Applied Microbiology and Biotechnology, v.73, n.2, p. 314-320, 2006.

LAN, Y.; WU, J.; WANG, X.; SUN, X.; HACKMAN, R. M.; LI, Z.; FENG, X. Evaluation of antioxidant capacity and flavor profile change of pomegranate wine during fermentation and aging process. Food Chemistry, v. 232, p. 777-787, 2017.

LEE, K. J.; LEE, J-R.; MA, K-H.; CHO, Y-H.; LEE, G-A.; CHUNG, J-W. Anthocyanin and isoflavone contents in Korean black soybean landraces and their antioxidant activities. Plant Breeding and Biotechnology, v.4, n.4, p.441-452, 2016.

LEE, M.; HONG, G.-E.; ZHANG, H.; YANG, C.-Y.; HAN, K.-H.; MANDAL, P. K.; LEE, C.-H. Production of the isoflavone aglycone and antioxidant activities in black soymilk using fermentation with Streptococcus thermophilus S10. Food Science and Biotechnology, v. 24, n. 2, p. 537-544, 2015.

LI, H.; YAN, L.; WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHOU, Q.; SUN, T.; CHEN, W.; ZHANG, H. Fermentation characteristics of six probiotic strains in soymilk. Annals of Microbiology, v.62, n. 4, p. 1473-1483, 2012.

LIU, K. (2008). Food Use of Whole Soybeans. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. (Ed.) Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization. Urbana, Illinois: AOCS Press. p. 441-481, 2008.

LIU, K. Nonfermented oriental soyfoods. In LIU, K. (Ed.). Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization. New York: Aspen Publishers, 1999. 532p.

MACFIE, H. J. H. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. Journal of Sensory Studies, v.4, n.2, p.129-148, 1989.

MACRAE, R. HPLC in food analysis. 2ª ed. New York. Academic Press, 1998. p.77 (Food Science and technology: a series of monoghraphys).

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. Sensory evaluation techniques, 1991. 354p. 2ed. Florida – USA: CRC Press.

MIGUEL, P. R.; MARMITT, T.; SCHLABITZ, C.; HAUSCHILD, F. A. D.; DE SOUZA, C. F. V. Desenvolvimento e caracterização de “iogurte”de soja sabor morango produzido com extrato de soja desengordurado enriquecido com cálcio. Alimentos e Nutrição, v. 21, n. 1, p. 57-63, 2010.

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

MURPHY, P.A. (2008). Soybean proteins. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. (Ed.) Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization. Urbana, Illinois: AOCS Press. p. 229-267, 2008.

NIE, Q.; FENG, L.; HU, J.; WANG, S.; CHEN, H.; HUANG, X.; NIE, S.; XIONG, T.; XIE, M. Effect of fermentation and sterilization on anthocyanins in blueberry. J Sci Food Agric, v. 97, n. 5, p. 1459-1466, 2017.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

PAULSEN, M. R. (2008). Measurement and maintenance of soybean quality. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. (Ed.) Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization. Urbana, Illinois: AOCS Press. p. 151-192, 2008.

PEREIRA, J. N. Avaliação de diferentes linhagens de soja preta quanto as suas características físico-químicas, nutricionais e compostos bioativos. Dissertação de mestrado, Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2015.

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

PREECE, K. E.; HOOSHYAR, N.; ZUIDAM, N. J., Whole soybean protein extraction processes: A review. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 43, p. 163-172, 2017.

PYO, Y.-H.; LEE, T.-C.; LEE, Y.-C. Effect of Lactic Acid Fermentation on Enrichment of Antioxidant Properties and Bioactive Isoflavones in Soybean. Journal of Food Science, v. 70, n. 3, p. 215-220, 2005.

RINALDONI, A. N.; CAMPDERRÓS, M. E.; PÉREZ PADILLA, A. Physico-chemical and sensory properties of yogurt from ultrafiltreted soy milk

concentrate added with inulin. LWT - Food Science and Technology, v. 45, n. 2, p. 142-147, 2012.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K.; SAHOO, D. (2010). Bioactive molecules in fermented soybean products and their potential health benefits. In: RAY, R. C.; MONTET, D. (Ed.) Fermented Foods, Part II: Technological Interventions. CRC Press. 525 p., 2017.

SLAVIN, M.; KENWORTHY, W.; YU, L. L. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of Maryland-grown soybeans with colored seed coats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 23, p.11174-85, 2009.

TAKAGI, A.; KANO, M.; KAGA, C. Possibility of Breast Cancer Prevention: Use of Soy Isoflavones and Fermented Soy Beverage Produced Using Probiotics. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, p. 10907-10920, 2015.

TAN, Y.; CHANG, S. K. C.; ZHANG, Y., Innovative Soaking and Grinding Methods and Cooking Affect the Retention of Isoflavones, Antioxidant and Antiproliferative Properties in Soymilk Prepared from Black Soybean. Journal of Food Science, v. 81, n. 4, p. 1016-1023, 2016.

TANTEERATARM, K.; NELSON, A.I.; WEI, L.S. Manufacturing of bland soymilk. In: WILLIAMS, S.W. Soybean processing for food uses. Urbana: INTSOY, 1999. p.154 -164.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, and propionibacteria. Journal of Dairy Science, n.86, p.2288–2296, 2003.

TORTORA, G., J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. (2005). Microbiologia. 8.ed. Porto Alegre: Artmed. 894p., 2005.

TRINDADE, C. S. F.; TERZI, S. C.; TRUGO, L. C.; MODESTA, R. C. D., COURI, S. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 51, n. 1, p. 1-7, 2001.

VONG, W. C.; LIU, S.-Q. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. Trends in Food Science and Technology, v. 52, p.139-147, 2016.

WALTER, E. H. M.; CARNEIRO, M. S.; FELBERG, I.; DE OLIVEIRA, D. R.; COSTA, S. D. O.; CONTE, C. Obtenção de bebidas fermentadas por probióticos a partir de diferentes matérias-primas da soja. Rio de Janeiro-RJ, 2016. 4p. (Embrapa. Comunicado Técnico, 219).

WANG, D.; MA, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, X. Thermal characterization of the anthocyanins from black soybean (Glycine max L. Merrill) exposed to thermogravimetry. Food Science and Technology, v. 55, p. 645-649, 2014.

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, n. 3, p. 333-338, 2003.

WICZKOWSKI, W.; SZAWARA-NOWAK, D.; TOPOLSKA, J. Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. Food Chemistry, v. 167, p. 115-123, 2015.

WU, C. H.; CHOU, C. C. Enhancement of aglycone, vitamin K2 and superoxide dismutase activity of black soybean through fermentation with Bacillus subtilis BCRC 14715 at different temperatures. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 22, p. 10695-10700, 2009.

WU, H.-J.; DENG, J.-C.; YANG, C.-Q.; ZHANG, J.; ZHANG, Q.; WANG, X.-C.; YANG, F.; YANG, W.-Y.; LIU, J. Metabolite profiling of isoflavones and anthocyanins in black soybean [Glycine max (L.) Merr.] seeds by HPLC-MS and geographical differentiation analysis in Southwest China. Analytical Methods, v. 9, n. 5, p. 792-802, 2017.

XU, B.; CHANG, S. K. Isoflavones, Flavan-3-ols, phenolic acids, total phenolic profiles, and antioxidant capacities of soy milk as affected by ultrahigh-temperature and traditional processing methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 4706-4717, 2009.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S.; Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium longum e Lactobacillus acidophilus. Ciência e Tecnologia de. Alimentos,v. 24, n.4, p. 674-679, 2004.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y.; TANG, X. J.; DENG, Y. Y.; CHI, J. W. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (Glycine max L. Merr.) varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 5935-5944, 2011.

CAPITULO 6 CONCLUSÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ O grão de soja preta BRM 09-50995 foi caracterizado em termos de composição centesimal, compostos bioativos (isoflavonas e antocianinas) e atividade antioxidante e os resultados obtidos estavam em conformidade com os valores encontrados na literatura para soja preta;
- ✓ Os processos tradicionais utilizados para obtenção de extrato de soja amarela não foram adequados à obtenção de extrato de soja preta devido à perda de antocianinas ao longo dos processos. Neste sentido, o processo desenvolvido constituído pelas etapas de moagem dos grãos, cozimento (80 °C / 5 min), homogeneização, centrifugação e pasteurização (98 °C / 5 min), foi o mais adequado para obtenção de extrato de soja preta com maior teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante;
- ✓ O processo de fermentação promoveu alteração na composição centesimal, no conteúdo de antocianinas e no perfil de isoflavonas do extrato de soja preta. As alterações nos compostos bioativos influenciaram, por sua vez, a atividade antioxidante estimada;
- ✓ O *L. acidophilus* foi capaz de utilizar os oligossacarídeos estaquiose e rafinose presentes no extrato de soja preta como fonte de carbono durante a fermentação. A cultura probiótica apresentou redução de 1 ciclo logarítimico a cada 14 dias de armazenamento;
- ✓ O processo de fermentação promoveu a conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas, sem alteração do conteúdo total;

- ✓ A aceitação de bebida achocolatada formulada a partir do extrato de soja preta foi similar a uma bebida orgânica de soja amarela sabor chocolate. No entanto, a aceitação de ambas foi inferior à bebida líder de mercado. A fermentação contribuiu para a melhor aceitação sensorial de bebidas de soja preta. A formulação com diferentes sabores pode aumentar de forma significativa a aceitação das bebidas fermentadas de soja preta, com destaque para sabores comumente utilizados para bebidas lácteas, a exemplo do sabor morango;
- ✓ As bebidas de soja preta podem ser consideradas produtos em potencial para promover o consumo deste tipo de soja no mercado ocidental.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudos complementares comparando a fermentação de extrato de soja amarela comercial e do extrato de soja preta desenvolvido durante 28 dias de armazenamento;
- Estudos de avaliação de diferentes combinações de culturas probióticas e sua influência nas características do extrato de soja preta fermentado;
- Estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o efeito na saúde do consumo dos produtos desenvolvidos quanto às propriedades relatadas em literatura científica;
- Avaliação de outros métodos para determinação de atividade antioxidante;
- Estudo de processamento de outros produtos a partir do extrato de soja preta obtido neste trabalho;
- Desenvolvimento e avaliação de produtos utilizando a okara de soja preta.