

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

CÁSSIA FERNANDA AVRELLA
FRANCIELE CARGNIN
SCHIRLEN FERNANDA BERWANGER

**BEBIDA PROBIÓTICA *PLANT-BASED* DE EXTRATO DE HIBISCO E SOJA:
EFEITO DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS**

São Miguel do Oeste – SC

2023

CÁSSIA FERNANDA AVRELLA
FRANCIELE CARGNIN
SCHIRLEN FERNANDA BERWANGER

**BEBIDA PROBIÓTICA *PLANT-BASED* DE EXTRATO DE HIBISCO E SOJA:
EFEITO DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Tecnologia em Alimentos do Câmpus
São Miguel do Oeste do Instituto Federal de
Santa Catarina como requisito parcial à obtenção
do diploma de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof^o Dra. Tahis Regina Baú

São Miguel do Oeste – SC

2023

RESUMO

Devido à crescente demanda mundial por alimentos à base de plantas e à busca por dietas mais saudáveis, observa-se uma lacuna no mercado de produtos fermentados vegetais, especialmente bebidas probióticas *plant-based* ou "à base de plantas". Neste contexto, os extratos de hibisco e a soja destacam-se por apresentar elevado teor de compostos bioativos, podendo conferir uma bebida com elevado valor nutricional. Considerando os efeitos benéficos dos micro-organismos probióticos na saúde, o objetivo deste projeto foi desenvolver uma bebida probiótica *plant-based* de extrato de hibisco e soja e avaliar os seus efeitos dos parâmetros de processamento sobre as características físico-químicas e funcionais. O estudo utilizou um planejamento fatorial 3^2 para analisar diferentes concentrações de sacarose (2, 6 e 10 %) e diferentes temperaturas (27, 37 e 47 °C) no processo de fermentação. Foi avaliado o efeito do teor de sacarose e temperatura nas características físico-químicas (pH e acidez), e nas propriedades funcionais (teor de antocianinas e contagem do probiótico *Lactocaseibacillus paracasei* BGP 1). A viabilidade celular do probiótico foi determinada pelo método de contagem em placa, a análise de pH se determinou por medição em potenciômetro e a acidez por titulação, enquanto a análise de antocianinas foi determinada pelo método do pH diferencial. Os valores obtidos para o pH variaram de 4,4 a 6,05, sendo o menor valor de pH obtido quando a bebida foi formulada com 10% de sacarose e fermentada a 37°C. Na determinação de acidez o maior valor obtido foi de 0,22g de ácido láctico/100 mL de amostra. Na contagem de *L. paracasei*, a bebida apresentou viabilidade probiótica com valores que variam de 7 a 9,5 log UFC/mL, sendo definido como limite mínimo 6 log UFC/mL. Na determinação de antocianinas os valores variaram de 4,6 a 21,7 mg de antocianinas /L de amostra, sendo que o menor valor foi atingido quando a bebida apresentou maior viabilidade probiótica. Estes dados indicam que as antocianinas podem estar sendo metabolizadas pelos micro-organismos durante o processo fermentativo. A condição ideal de fermentação que otimiza os parâmetros experimentais é de 6% de sacarose e incubação a 37°C. A bebida *plant-based* formulada com extrato de hibisco e soja apresentou alta viabilidade de *L. paracasei*, podendo ser considerada probiótica.

Palavras-chave: Fermentação; *Lactocaseibacillus paracasei*; alimentos funcionais; antocianinas; veganismo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1	Bebidas <i>plant-based</i>	6
2.1.1	Extrato aquoso de hibisco	8
2.1.2	Extrato aquoso de soja	12
2.2	Micro-organismos probióticos em bebidas	16
2.2.1	Viabilidade dos probióticos em bebidas	24
2.2.2	Biotransformações em bebidas probióticas	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Matéria-prima e ingredientes	29
4.2	Desenvolvimento da bebida <i>plant-based</i> probiótica	29
4.2.1	Elaboração do extrato de hibisco	29
4.2.2	Formulação da bebida <i>plant-based</i> probiótica	30
4.2.3	Planejamento fatorial e desenvolvimento da bebida	31
4.3	Procedimento analíticos	34
4.3.1	pH	34
4.3.2	Acidez total titulável	34
4.3.3	Determinação de antocianinas monoméricas	35
4.3.4	Viabilidade celular	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Efeito do teor de sacarose e temperatura de fermentação nas propriedades da bebida <i>plant-based</i> de extrato de hibisco e soja	37
5.2	pH e acidez	38
5.3	Antocianinas	44
5.4	Contagem de <i>L. paracasei</i>	48
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas *plant-based* compõe um novo estilo de vida, sendo visada por muitas pessoas não apenas por causa de questões dietéticas, mas também por crenças individuais. O Brasil, devido a sua ampla biodiversidade, apresenta um alto potencial para atuar de forma ativa no cenário global na produção destas bebidas (Boas *et al.*, 2023). Alimentos *plant-based* atendem não apenas os consumidores adeptos do vegetarianismo e veganismo, mas também são uma opção para indivíduos com restrições alimentares específicas como intolerância à lactose, alergia a proteínas do leite e para público em geral que procura reduzir a ingestão de alimentos de origem animal (Sangaleti, 2022). É crescente a popularidade de dietas e alimentos *plant-based*, e muitas indústrias alimentícias têm se adaptado para oferecer opções que facilitem a dieta das pessoas que seguem esse estilo de vida (Neto *et al.*, 2020). Os alimentos que compõem esta dieta caracterizam-se por apresentar compostos antioxidantes e com ação anti inflamatória, sendo considerados um importante aliado na prevenção contra as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (Aguiar; Santos, 2022).

O extrato aquoso de hibisco vem chamando a atenção das indústrias de alimentos, bebidas e farmacêuticas, que começam visualizar a possibilidade de exploração desse vegetal como matéria-prima para elaboração de vários alimentos e como fonte natural de corante (Vizzotto *et al.*, 2009). O cálice de hibisco tem um alto teor de cinzas totais, carboidratos bem como, os baixos teores de lipídios e proteínas (Abreu *et al.*, 2019). A soja é a principal *commodity* agrícola produzida no país (Embrapa, 2023) e seu extrato aquoso destaca-se por apresentar alto teor de nutrientes, principalmente proteínas e carboidratos. Ainda, a soja é considerada uma importante fonte de isoflavonas, como genisteína, genistina, daidzeína, daidzina são consideradas as principais (Salgado, 2017), e seu extrato aquoso destaca-se por apresentar composição química similar ao leite de vaca, com bom potencial para ser utilizado como substrato para fermentação por probióticos.

Os probióticos são organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (Leandro, 2021). Este grupo de micro-organismos, que pode ser utilizado na elaboração de bebidas *plant-based*, possuem alegação de propriedade funcional de acordo com a legislação brasileira. A biotransformação em bebidas *plant-based* por micro-organismos probióticos representa não apenas uma estratégia para preservação de alimentos, mas também um processo eficiente para elevar a diversidade de nutrientes e propriedades bioativas (Zhong *et al.*, 2021). Vários estudos revelam que as

propriedades das bebidas são alteradas durante sua fermentação, podendo aumentar ou reduzir seu teor dos compostos bem como suas propriedades terapêuticas. Neste contexto, fermentar o extrato aquoso de hibisco e soja com bactérias probióticas é uma alternativa que atende aos desafios atuais no desenvolvimento de novos produtos. Entretanto, as condições de processamento podem afetar as propriedades físico-químicas e funcionais da bebida, pois altera o metabolismo dos probióticos.

Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma bebida probiótica *plant-based* de extrato de hibisco e soja e avaliar o efeito dos parâmetros de processamento sobre as características físico-químicas e funcionais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bebidas *plant-based*

Alimentos *plant-based* ou “à base de plantas”, representam um nicho de mercado que vem crescendo nos últimos anos, trazendo um apelo de alimentação saudável por estar associado ao estilo de vida de uma parcela da população. Segundo Luz e Pallone (2022), o consumo de bebidas e alimentos à base de plantas é ascendente em todo o mercado mundial. Isso ocorre porque o público adepto a esse tipo de dieta, como os vegetarianos, veganos e intolerantes e/ou alérgicos a alimentos de origem animal, buscam cada vez mais uma melhor qualidade de vida e o desenvolvimento de novos hábitos alimentares. Os alimentos *plant-based* atendem a públicos distintos e os principais critérios de escolha destes alimentos, são as características sensoriais e o preço (Maciel Neto, 2019).

O consumo balanceado de alimentos de origem vegetal está diretamente relacionado ao bom funcionamento do organismo e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), o que fomenta ainda mais o consumo destes alimentos e incentiva a redução no consumo de alimentos de origem animal (Aleixo *et al.*, 2021). Assim, o consumo de uma maior diversidade de alimentos vegetais como frutas, grãos integrais, oleaginosas e vegetais, está correlacionada a menores riscos de doenças cardiovasculares (Satija; Hu, 2018). O estudo apresentado por McMacken e Shah (2017) concluiu que adotar um estilo de vida baseado no consumo de *plant-based* pode auxiliar no tratamento de doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão e inflamação do organismo, além de diminuir o risco de câncer.

Apesar dos consumidores aumentarem a busca por produtos vegetais, estes produtos diferem dos alimentos de origem animal quanto a composição química e características sensoriais. Há muitas diferenças entre as características do leite animal e os extratos vegetais. O leite animal é proveniente de mamíferos como vacas, búfalas, ovelhas e cabras, enquanto as bebidas vegetais são obtidas através do processamento dos grãos e sementes de cereais, leguminosas e oleaginosas. Uma das leguminosas geralmente utilizadas na elaboração de extratos vegetais é a soja, que possui um elevado teor de proteínas. Seu extrato hidrossolúvel quando enriquecido de Cálcio, vitamina D e vitamina B12, se assemelha ao leite de origem animal, podendo servir como substituto do leite do ponto de vista nutricional. Os demais extratos vegetais geralmente não possuem elevado teor de proteínas e precisam ser fortificados

para serem considerados substitutos do leite integral pasteurizado ou UHT (Cirilo; Olivieri; Martins, 2020).

A crescente demanda por produtos vegetais levou a indústria a oferecer novas opções para esse mercado, sendo as bebidas vegetais produzidas através da maceração de ingredientes vegetais em água. Elas são fortificadas para equilibrar a composição nutricional. No entanto, o desenvolvimento desses produtos ainda está em andamento, buscando melhorar o sabor e atrair mais consumidores (Block *et al.*, 2020).

Reis e Siqueira (2021) realizaram um estudo com o objetivo de enumerar produtos de origem vegetal, considerados imitadores lácteos, listaram um total de 225 produtos presentes no mercado brasileiro, sendo elaborados por uma variedade de matérias-primas vegetais, em sua grande maioria formuladas a partir do extrato hidrossolúvel de soja e outros vegetais como arroz, extrato de amêndoas, coco, castanha-de-caju e por último, de aveia. Existem no mercado bebidas, iogurtes, queijos e manteigas a base de vegetais, sendo que o maior número de produtos encontrados são as bebidas em ascendência quando comparado aos outros imitadores lácteos (Quadro 1). Dentre as marcas destacam-se Ades, oferecendo bebidas a base de soja, amêndoas, coco e outros vegetais com uma diversidade de sabores podendo ser adicionadas de sucos de frutas, fortificadas de vitaminas e minerais, a Yoki que atua na mesma linha de produtos com uma infinidade de sabores, a Almond Breeze oferece produtos a base de amêndoas com uma grande importância, entre outras marcas listadas que representam o mercado nacional.

Quadro 1 – Principais marcas de bebidas elaboradas a partir de matrizes vegetais

Marcas	Bebidas
ADES	à base de soja, amêndoa, coco, adicionadas de suco de frutas.
YOKI	à base de soja adicionadas de suco de frutas.
ALMOND BREEZE	à base de amêndoas saborizada e adicionada de suco de frutas.
NESTLÉ	Linhas a base de soja puro e em sabores e linhas com bebida de arroz integral e bebida de aveia integral.
ALPRO	A empresa belga oferece bebidas vegetais, como soja, amêndoa, coco, arroz, aveia e avelã.
DANONE	Bebidas à base de amêndoas sabores original, original sem açúcar, baunilha e baunilha sem açúcar.

SILK	Bebidas vegetais à base de coco, castanha-de-caju e amêndoas.
BATAVO	Bebidas e sobremesas vegetais à base de soja nas versões com e sem adição de açúcares, também versões saborizadas.
NATURE'S HEART	Bebidas vegetais à base de coco, arroz, castanha-de-caju e amêndoas, também em versões adicionadas de cacau.

Fonte: Autoria própria (2023).

Existe um apelo comercial para o consumo destes produtos, sendo destacado a ausência de lactose, ausência de produtos de origem animal, baixo teor de gordura, entre outros benefícios que os consumidores buscam ao comprarem produtos *plant-based*, visando uma alimentação mais saudável e diversificada (Reis; Siqueira, 2021).

O potencial terapêutico dos alimentos *plant-based* pode ser aumentado pela adição de micro-organismos probióticos, por meio da fermentação. A fermentação láctica tem como principal matriz o leite de origem animal, entretanto, as matrizes vegetais vem ganhando espaço entre os consumidores de produtos funcionais, e são substratos elegíveis para o crescimento microbiano (De Souza *et al.*, 2020). Produtos lácteos fermentados são considerados as melhores matrizes no fornecimento de probióticos, entretanto, a obtenção de alimentos probióticos de matrizes não lácteas vem sendo crescente e amplamente investigado (Swain, 2014). De acordo com Deziderio (2019), substituir os ingredientes lácteos na fermentação por extratos vegetais é viável, pois as bebidas vegetais são um bom substrato para o crescimento de probióticos.

2.1.1 Extrato aquoso de hibisco

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Figura 1) vem atraindo a atenção das indústrias de alimentos, de bebidas e farmacêuticas, que começam a vislumbrar a possibilidade de exploração racional desse vegetal como matéria-prima para elaboração de alimentos e como fonte natural de corantes (Vizzotto *et al.*, 2009). Dentre os seus constituintes, a parte geralmente empregada na elaboração de alimentos e bebidas é o seu cálice.

Figura 1- Cálices de hibisco (*H. sabdariffa* L.)



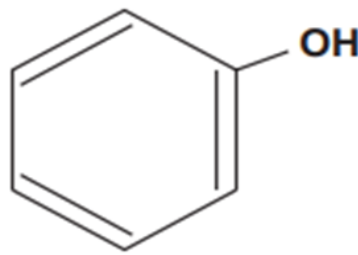
Fonte: Camillo (2015).

O cálice de hibisco possui alto teor de cinzas totais, carboidratos e fenólicos totais, além da atividade antioxidante, bem como, baixo teor de lipídios e proteínas. Abreu *et al.* (2019) determinaram a composição química dos cálice de hibisco, e encontraram os teores de umidade de $61,76\% \pm 1,15$, cinzas de $8,6\% \pm 0,03$, lipídios de $0,85\% \pm 0,07$, proteínas de $0,2\% \pm 0,00$, carboidratos de $28,59\%$. Os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante em *H. sabdariffa* L. foi respectivamente igual a $429,84 \pm 5,16$ (EAG/100g) e $626,32 \pm 8,03$ ($\mu\text{mol Trolox/L}$). Em função da sua composição química e teor de compostos bioativos presente, o cálice do hibisco é utilizado pela população em situações de pressão alta, doenças hepáticas e febre, e as suas ações farmacológicas incluem atividade antioxidantes, atividade antipirética e não antiinflamatórias (Ali; Wabel; Blunden, 2005).

O hibisco é uma planta bioativa e possui um alto teor de antocianinas e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos de substâncias mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, com mais de 8.000 estruturas fenólicas atualmente (Bravo, 1998). Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos (Figura 2), nas formas simples ou de polímeros, que os conferem o poder antioxidante, podem ser naturais ou sintéticos (Angelo; Jorge, 2007).

Estes compostos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como: infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (Angelo; Jorge, 2007).

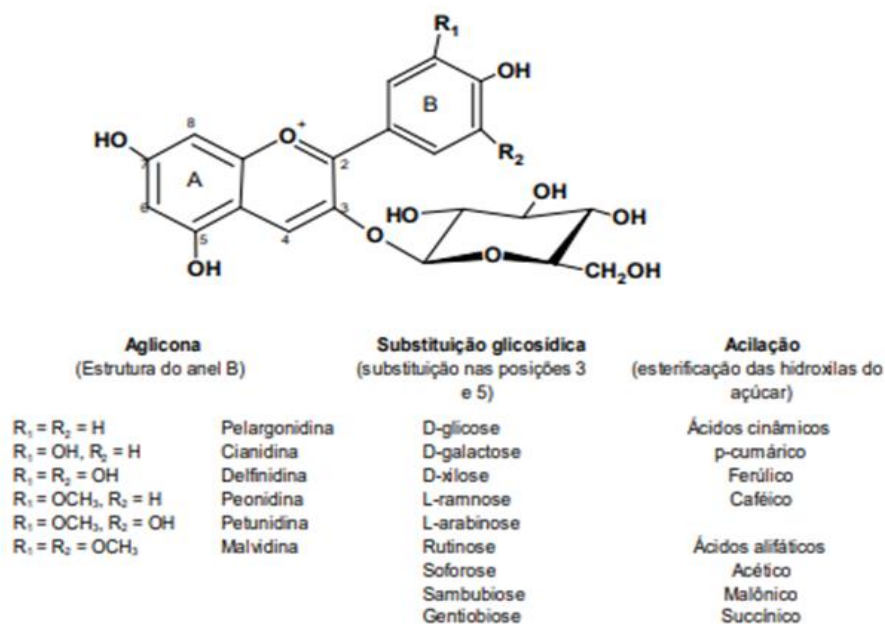
Figura 2 - Estrutura do Fenol



Fonte: Liu (2007).

Dentre os compostos fenólicos presentes no hibisco, destacam-se as antocianinas, que são flavonóides, grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. As antocianinas (Figuras 3 e 4) (das palavras gregas *anthos*, flor e *kianos*, azul) são pigmentos vegetais, responsáveis por uma grande variedade de cores observadas em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas, que podem variar do vermelho vivo ao violeta/azul. São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas, caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio. A molécula da antocianina é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos.

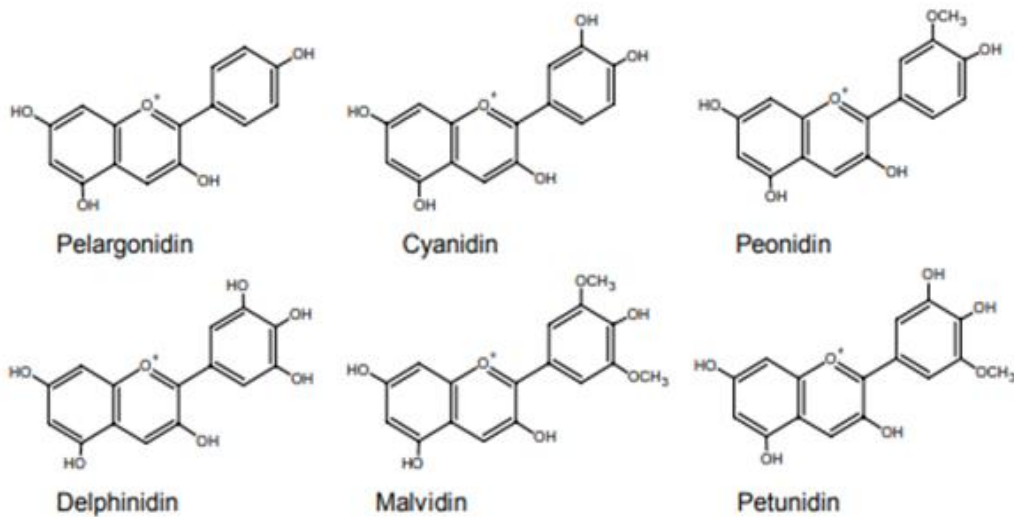
Figura 3 - Estrutura química das Antocianinas



Fonte: Malacrida; Motta (2006).

Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (Castañeda, 2009).

Figura 4 - Antocianinas mais importantes



Fonte: Rein (2005).

As antocianidinas, por sua vez, são flavonoides que quando glicosiladas originam as antocianinas. As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis responsáveis pelas cores vermelha, azul, rosa, magenta, violeta existentes em elementos da natureza. Os cálices de *H. sabdariffa* L. são bastante ricos neste composto.

As antocianinas foram os compostos majoritários nos cálices de hibisco, sendo que a delphinidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo representaram 41 e 13% do total de compostos fenólicos, respectivamente. Dentre os ácidos fenólicos, os componentes majoritários foram o ácido 3-cafeoilquínico e ácido 5-cafeoilquínico, representando 15 e 13% do total de compostos fenólicos, respectivamente (Piovesana, 2016).

O cálice pode ser empregado na forma *in natura* ou desidratado. A secagem do cálice de hibisco é uma alternativa que agrega praticidade a sua utilização na alimentação (Vizzotto; Castilho; Pereira, 2009). Os cálices de hibisco desidratado geralmente são utilizados na elaboração de bebidas como o chá, sendo que esta também pode ser chamada de extrato aquoso de hibisco, além disso, os extratos apresentaram pH entre 2,34 e 3,16 (Dos Santos *et al.*, 2014).

As condições de preparação da infusão podem afetar as características do extrato aquoso de hibisco. Dos Santos e Somera (2022) utilizaram 1,5g de cálice de hibisco desidratado e 75 mL de água destilada, e estudaram como as condições de infusão afetam a extração de compostos bioativos do hibisco. Os autores verificaram que a infusão do cálice de hibisco em 90°C por 35 minutos, confere um chá com maior teor dos compostos fenólicos e antocianinas.

Ribeiro *et al.* (2018), realizaram o chá de hibisco utilizando 2g do produto em 150 mL de água fervente, permanecendo na sua infusão por 15 minutos. Jabeur *et al.* (2017) realizaram infusão do cálice de hibisco a 100 °C por 5 minutos, utilizando 500 mg de amostra seca e 100 ml de água destilada. A Tabela 1 apresenta diferentes condições de preparo do chá de hibisco.

Outros autores utilizaram condições diferentes para elaborar o extrato aquoso de hibisco. No trabalho desenvolvido por Nguyen e Chuyen (2020) foi usado 1 g de cálice desidratado e 200 mL de água quente a 90 °C por 15 minutos. Os autores Sobota *et al.* (2016) efetuaram a infusão aquosa de cálices de hibisco utilizando 5 g de cálices e 200 mL de água a 80 °C deixando descansar por 15 minutos, seguido de filtragem.

Tabela 1 - Condições utilizadas para a infusão do cálice de Hibisco

Peso	Volume	Temperatura	Tempo	Referência
1g	200 mL	90°C	15 min	Nguyen e Chuyen (2020)
5g	200 mL	90°C	15 min	Sabota, Pinho e Oliveira (2016)
2g, 3,5g e 5g	100 mL	30°C, 45°C e 60°C	5, 7,5 e 10 min	Fonseca (2020)
2g	150 mL	100°C	15 min	Ribeiro <i>et al.</i> (2018)
500mg	100 mL	100°C	5 min	Jabeur <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Dos Santos e Somera (2022)

2.1.2 Extrato aquoso de soja

A soja, *Glycine max* (L) Merrill, é a principal *commodity* agrícola produzida no país, e o Brasil atualmente é o maior produtor mundial deste grão (Embrapa, 2023). Suas flores são de cor branca e suas vagens verdes que, quando maduras, tornam-se amarelo-pálido ou marrom

claro. As vagens possuem várias sementes, que apresentam forma arredondada e lisas (Nepomuceno; Farias; Neumaier, 2021).

O grão de soja verde é fonte de niacina, ácido ascórbico (vitamina C), riboflavina (vitamina B2), e pró-vitamina A, já madura, é ótima fonte de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), vitaminas E e K e ácido fólico. Por possuir em sua composição lipídios (óleo), carboidratos (açúcares e fibras), proteínas, e minerais, a soja é considerado um alimento calórico-protéico (Mandarino; Panizzi, 2021).

As proteínas da soja possuem alto valor biológico, podendo ser comparadas com as proteínas presentes nos alimentos de origem animal (Mandarino; Panizzi, 2021). O teor de proteína da soja alcança os 38 %, sendo que as globulinas são aproximadamente 90 % das proteínas presentes na soja e tem solubilidade em pH de 4,5 (Salgado, 2017; Pereira; Oliveira, 2006).

O óleo da soja é rico em ácidos graxos poli-insaturados: linoléico (Ômega-6) e Linolênico (Ômega-3), e lecitina (Mandarino; Panizzi, 2021). Nos grãos de soja os lipídeos chegam aos 20%, é composto de 20% de ácidos graxos saturados e 80% de ácido graxo mono e poli-insaturados, a soja é fonte de ácido alfa-linolênico (Salgado, 2017). Entretanto para Pereira e Oliveira (2006), a composição é de 13% de ácidos graxos Saturados (sendo 9% palmítico e 4% esteárico) e 86% de ácidos graxos insaturados (sendo 24% oléico, 54% linoléico e 8% linolênico), e ainda 1 a 3% de substâncias não-saponificáveis: tocoferóis, vitaminas A e esteróides (sitosterol, camosterol e estigmasterol).

Os carboidratos totais da soja são aproximadamente 30%, desse total os açúcares livres somam 8% (Pereira; Oliveira, 2006), sendo que 4% é rafinose, 36% de estaquiase e 60% é de sacarose. No grão de soja estão presentes carboidratos insolúveis que são: a hemicelulose, celulose, lignina e traços de amido, os três primeiros são chamados de fibras insolúveis, por serem componentes estruturais da parede celular (Mandarino, s/d), por outro lado as fibras solúveis chegam a 30% (Moraes, 2001). O extrato de soja por conter em sua formulação oligossacarídeos naturais (rafinose e estaquiase), que são classificados como prebióticos ao auxiliar o desenvolvimento de probióticos (Simpósio de Alimentos, 2009).

A soja é composta de aproximadamente 5 a 6% de minerais, e pode ser considerada uma fonte moderada de cálcio (Mandarino; Panizzi, 2021). Os minerais que são encontrados na soja podem ser divididos em dois grupos os macronutrientes que são: fósforo, magnésio, cálcio e potássio, e os micronutrientes que são ferro e zinco (Mandarino, s/d).

Os principais compostos fitoquímicos da soja são: fitatos, inibidores de proteases, isoflavonas, saponinas, compostos fenólicos, fitoesteróis, polipeptídeos de baixo peso molecular, ácidos graxos poliinsaturados, fosfolipídios (lecitina, cefalina, fosfatidil inositol), oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) e tocoferóis (vitamina E) (Mandarino; Panizzi, 2021). Dentre os compostos fitoquímicos o que mais se destaca é as isoflavonas, sendo que os teores encontrados são entre 12 e 461 mg x 100⁻¹ (Carrão-Panizzi *et al.*, 2009). Os isoflavonóides e as proteínas da soja, auxiliam na prevenção de doenças como: osteoporose, doenças renais, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares aterosclerótica e alguns tipos de câncer (Salgado, 2017).

Considerando a composição química da soja, o uso deste grão pode ser considerado promissor na alimentação humana. Um dos derivados utilizados como substituto do leite animal é o extrato aquoso de soja. O extrato aquoso de soja é um produto livre de colesterol, não contém lactose, podendo ser consumidos também por pessoas alérgicas ao leite de vaca. Contém proteínas, ácidos graxos insaturados, linolênico, linoléico e oléico, apresenta baixo teor de sódio. Seu pH é em torno de 6,6, e no organismo sua ação é neutralizante de acidez (Benassi; Mandarino, 2003).

O extrato de soja pode ser obtido por diferentes métodos, sendo os mais conhecidos o método de Cornell (*Cornell method*), método de Illinois (*Illinois method*) e método da hidratação rápida (*Rapid hydration hydrothermal cooking*). O método de Cornell foi desenvolvido na Universidade de Cornell nos EUA, é um método com trituração a quente, não utilizando a maceração da soja como etapa anterior à trituração. A soja descascada é adicionada em um triturador ligeiramente aquecido com água quente. A temperatura deve ser mantida em torno de 80 a 100°C para inativação da lipoxigenase. É realizada a fervura através de jatos de vapor por 10 minutos e com agitação constante. Em seguida é centrifugada a mistura e o extrato é engarrafado e esterilizado a 121°C por 12 minutos. A temperatura da água no início do processo não pode ser menor que 80°C para evitar a formação de sabor de feijão cru, conhecida como *beany flavor*, para isso é necessário aquecer a soja antes.

Já o método de Illinois foi desenvolvido pela Universidade de Illinois nos EUA, ficou popularmente conhecido como método do pré-branqueamento. É utilizado um branqueamento com água fervente dos grãos secos por 20 minutos ou de grãos pré-hidratados por 10 minutos, nessa etapa ocorre a inativação das enzimas. São separados os grãos e feita a trituração com água fria, devendo alcançar 12% de sólidos totais. Ocorre um aquecimento até 93,3°C e a mistura é homogeneizada, nessa etapa podem ser adicionados 0,25 a 0,5% de bicarbonato de

sódio, a adição do ácido clorídrico é utilizado para neutralizar. De outro modo, o método da hidratação rápida nesse processamento a soja é transformada em farinha para ser misturada com água quente, essa mistura é submetida a jatos de vapor a 150°C por 30 segundos e nessa etapa ocorre a inativação das enzimas. A mistura é resfriada e com adição de água é feito o ajuste para 10% de sólidos totais, e centrifugada, para separação do extrato (Venturini Filho, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que o extrato aquoso de soja é um substrato adequado para o crescimento de probióticos. Marin *et al.* (2014), realizaram a caracterização físico-química e sensorial de bebida probiótica de soja, e desenvolveram uma bebida à base de extrato de soja, frutooligossacarídeo e lactosoro, saborizada com mel e fermentada com o micro-organismo *Lactobacillus acidophilus*. A bebida apresentou parâmetros físico-químicos adequados, obteve um resultado adequado para contagem de número de células viáveis que caracteriza os produtos probióticos conforme o padrão da legislação brasileira, e foi aceita sensorialmente, com maior nota no atributo sabor.

Bren, dos Santos e de Almeida (2010) desenvolveram uma bebida probiótica a partir de extrato solúvel de soja, utilizaram em sua formulação 50% extrato solúvel de soja, 50% água, 11,5% de leite em pó e 8% glicose. A bebida apresentou boas características, sendo utilizada para fermentação do mix de bactérias probióticas, havendo crescimento adequado na bebida.

Ferreira, Faria e Munhoz (2019) também elaboraram bebidas fermentadas de soja por probióticos e acrescidas de prebióticos, as bebidas obtiveram características físicas conforme a literatura, a bebida a base de extrato de soja foi inserida de prebióticos, contendo formulação padrão (sem prebiótico), formulação 1 (5% de inulina), formulação 2 (5% frutooligossacarídeos), formulação 3 (5% de frutooligossacarídeos e 5% de inulina), e adicionadas de culturas lácticas probióticas (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *L. acidophilus*). Os extratos de soja fermentados adicionados com frutooligossacarídeos e inulina apresentaram os seguintes resultados para caracterização físico-químicas: pH padrão (4,21) e as amostras 1, 2 e 3 apontam os seguintes resultados 4,25, 4,26 e 4,30, respectivamente, para atividade de água o resultado padrão apontam 0,975 e as amostras 1, 2 e 3 exibem os resultados 0,978, 0,973 e 0,980, e os sólidos solúveis (°Brix) apresentaram o padrão de 20°Brix e as amostras 1, 2 e 3 mostram os resultados de 23, 20 e 23, respectivamente. Estes estudos indicam que o extrato hidrossolúvel de soja é considerado uma matriz vegetal adequada para o desenvolvimento de probióticos.

2.2 Micro-organismos probióticos em bebidas

Alimentos que fornecem benefícios à saúde, além da função de nutrir são considerados alimentos funcionais, e os probióticos são micro-organismos que possuem alegação de propriedade funcional. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), probióticos são organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (Leandro, 2021). Este grupo de micro-organismo geralmente é utilizado nas indústrias de produtos lácteos, devido a facilidade de se adaptar e desenvolver no leite de origem animal.

Os probióticos promovem inúmeros benefícios à saúde humana, como a prevenção de câncer de cólon e atividade antimicrobiana (Wendling; Weschenfer, 2013), além de contribuem também na prevenção de doenças cardiovasculares, doenças intestinais e diabetes (Villamil *et al.*, 2020), auxiliam na manutenção do sistema imune, na síntese de vitaminas do complexo B, melhoram a digestibilidade da lactose (Badaró *et al.*, 2008), atuam em desarranjos intestinais e no aumento da absorção dos minerais (Santos *et al.*, 2011). O estudo desenvolvido por Oliveira *et al.* (2002) afirma que o consumo de probióticos auxilia na melhora da qualidade de vida de pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa, oriundas do desequilíbrio do sistema imunológico.

As mudanças nos hábitos alimentares e uma busca por um estilo de vida mais saudável colocam estes alimentos em ascensão, porém, é importante salientar que o consumo diário de alimentos funcionais probióticos devem conciliar com um hábito de vida saudável e uma alimentação diversificada para alcançar seus efeitos benéficos oferecidos (Costa *et al.*, 2013).

Os benefícios terapêuticos promovidos pelos probióticos são obtidos quando estes micro-organismos permaneçam vivos quando entrarem em contato com o suco gástrico presente no estômago, para posteriormente se aderirem a mucosa entérica e disputar espaço e nutrientes com micro-organismos patogênicos presentes no intestino (Nogueira; Gonçalves, 2011). Estudos apontam que é necessário garantir a viabilidade dos probióticos maior que $9 \log$ por porção, durante o processamento ou armazenamento, para apresentar os efeitos esperados à saúde (Hill *et al.*, 2014).

Diferentes espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobactérias* tem sido empregado na elaboração de bebidas *plant-based*, como *Limosilactobacillus fermentum*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*,

Lacticaseibacillus rhamnosus, *Lacticaseibacillus casei*, and *Bifidobacterium* sp (Baú *et al.*, 2023). As indústrias que atuam na área de laticínios e que buscam desenvolver e produzir produtos funcionais, possuem em suas formulações principalmente os micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Santos *et al.*, 2011; Dos Santos; Varavallo, 2011).

Dentre os micro-organismos mais empregados destaca-se o gênero *Lactobacillus* criado em 1.901, abrangendo mais de 261 espécies, são bactérias Gram-positivas, mesófilas, em forma de bastonetes, seus arranjos ocorrem aos pares, em cadeias curtas ou de forma isolada, possuem a parede celular espessa, são anaeróbios facultativos e fermentadores de carboidratos, convertendo-os em ácido-lático, seu principal metabólito (Anvisa, 2021).

Foi publicada uma nova classificação taxonômica do gênero *Lactobacillus* no "*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*", por Zheng *et al.* (2020), nesse estudo, das 261 espécies avaliadas, apenas 38 permaneceram classificados como *Lactobacillus*, enquanto os demais foram subdivididos em 25 gêneros, dos quais 23 são gêneros novos. Essa reorganização reflete uma compreensão mais detalhada da diversidade e relacionamentos dentro do gênero *Lactobacillus*.

Lacticaseibacillus casei (LCG) é um grupo dentro da família *Lactobacillaceae* composto por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lacticaseibacillus rhamnosus*, que são filogeneticamente e fenotipicamente semelhantes, *Lacticaseibacillus casei* e *Lacticaseibacillus paracasei* têm uma relação muito próxima e são semelhantes em termos de suas características (Cui ; Qu, 2021).

Rocha (2020) avaliou as curvas de crescimento de diferentes linhagens (*Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Pediococcus* e *Enterococcus*) de micro-organismos conclui que nas temperaturas que variam de 30°C e 37°C, nenhuma temperatura de crescimento foi limitante para nenhuma linhagem, no entanto, todas obtiveram maior crescimento a 37°C após 12h de incubação. Sendo assim, utilizaremos o micro-organismo *Lacticaseibacillus paracasei* como cepa fermentadora da bebida *plant-based* probiótica.

A atividade probiótica presente nas bebidas fermentadas se refere principalmente à ação de bactérias ácido-láticas (BAL) (Da Silva Carneiro *et al.*, 2012). A fermentação é um processo bioquímico que faz parte dos processos de conservação e transformação de matérias-primas promovida pela atividade metabólica dos micro-organismos na produção de alimentos (Gonçalves *et al.*, 2021). Balthar (2022) afirma que bebidas fermentadas à base de plantas por BAL apresentam de forma positiva viabilidade e estabilidade celular, sendo satisfatória para a fermentação láctica, demonstrando características sensoriais harmoniosas e convenientes.

Utilizar destes probióticos em alimentos além de promover a funcionalidade, benefícios à saúde e prevenção de doenças, proporcionam características sensoriais únicas amplamente utilizadas na produção de alimentos derivados lácteos, produtos cárneos, vegetais e panificados. Nos derivados lácteos é comum serem adicionados de probióticos bebidas como o iogurte, kefir, leite fermentado, queijos, entre outras. Apesar do emprego de probióticos ser mais frequente em alimentos lácteos, a incorporação em alimentos de origem vegetal vem ganhando espaço.

Estudos realizados com bebida fermentada com extrato hidrossolúvel de soja (EHS), bebidas fermentadas de aveia, arroz, amêndoas, castanha-do-brasil e soja, bebida probiótica de suco de maracujá, bebida probiótica de sabor manga e uva, bebida probiótica de suco de cajá, bebida probiótica fermentada com EHS adicionada de polpa de grumixama, inulina e whey protein, bebida probiótica de suco de cajú e bebida probiótica de suco de uva demonstraram que a utilização de probióticos em bebidas *plant-based* é viável (Tabela 2). Na maioria dos estudos investigou-se as características físico-químicas desenvolvidas após o processo fermentativo, bem como as biotransformações de compostos antioxidantes presentes nas matrizes utilizadas e a viabilidade celular após períodos de armazenamento e estocagem.

Tabela 2 - Bebidas probióticas elaboradas a base de plantas

Bebida	Micro-organismo probiótico	Parâmetros avaliados	Formulação	Principais resultados	Referência
Bebida fermentada de EHS	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 e por <i>Bifidobacterium bifidum</i> BB-12	Contagem BAL; pH; Análise sensorial.	80,5% (50% água, 50% extrato solúvel de soja); 8% glicose e 11,5% de leite em pó.	Contagem < 10 ⁸ UFC/mL/g; pH 4,5 – 5,0; 81,33% de aceitabilidade.	(Bren <i>et al.</i> , 2010)
Bebidas fermentadas: de aveia, arroz, amêndoas, castanha-do-brasil e soja;	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, e <i>Bifidobacterium</i> BB-12	°Brix; Acidez titulável; pH; Lípidios; Extrato seco; Cinzas; Proteínas; Carboidratos; Contagem BAL.	Extrato vegetal (matriz/água): arroz, soja, amêndoas, castanha-do-Brasil Na proporção 10% (m/m); Aveia (matriz/água) na proporção 8% (m/m); Formulação 2: Utilização Açúcar refinado padronizado a 4° Brix (CA).	Determinação de 12h do processo fermentativo; Ajuste sólidos solúveis não influenciou a taxa de desenvolvimento BAL; Castanha-do-Brasil apresentou melhor desempenho.	(DEZIDERI O, 2019)

Bebida probiótica de suco de maracujá	<i>Lactobacillus casei</i>	Contagem BAL; pH; Análise Biomassa; ° Brix; Acidez Total; Acidez láctica; Vitamina C; Análise Sensorial.	Formulação 1: Proporção de 1:3 (suco: água mineral) pH original 3,03 Formulação 2: Proporção de 1:3 (suco: água mineral) pH ajustado 6,0 e Adição de NaOH 5 M.	Ajuste com NaOH apresentou maior viabilidade probiótica (21 dias); Formulação com pH ajustado apresentou maior viabilidade probiótica (21 dias); Determinação do tempo e temperatura de fermentação 30°C /20h.	(Machado; Rizzato, 2019)
Bebida probiótica de sabor manga e uva	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Determinação do crescimento durante a fermentação T0 ao T6; Viabilidade celular; pH; °Brix.	Suco comercial de manga e uva adicionado de açúcar e sem conservantes, adicionados de solução tamponante NaOH até o pH de 6,5;	Suco de manga obteve crescimento até 6 horas, com consumo de açúcar e pouca alteração no pH. Aos 15 dias a viabilidade celular decresceu. No suco de uva, no tempo de 6 horas a viabilidade celular já havia decrescido com consumo de açúcares e alteração do pH.	(Souza, 2014)

Os substratos se mostraram viáveis no crescimento de *L. Acidophilus*.

Bebida probiótica de suco de cajá	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495	Delineamento composto central para definição de Temperatura, Tempo e pH; pH; Acidez titulável; Sólidos Solúveis Totais; Cor; Viabilidade probiótica; Viabilidade Gastrointestinal; Compostos Fenólicos Totais; Atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH;	Suco de Cajá extraído e filtrado, padronizado a 8,0 °Brix pela adição de água destilada e pH ajustado para 6,4 com bicarbonato de sódio de grau alimentício;	Determinação da temperatura, tempo e pH de fermentação: 30°C /16h / pH 6,4; Diminuição dos compostos fenólicos após o processo fermentativo, consequentemente diminuição da atividade antioxidante, Apresentou viabilidade e estabilidade probiótica aos 28 dias sob refrigeração a 4° C e contagem de 8,7 Log UFC/mL;	(Ribeiro, 2019).
Bebida probiótica fermentada (EHS) adicionada de	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Acidez Titulável; Cinzas; Lipídeos; Proteína;	Formulação 1: 6% de EHS, 15% de polpa de Grumixama, 8% de açúcar cristal, 0,05% de goma arábica/acácia, 4% da	A adição de inulina e whey protein corroboram de forma positiva com os parâmetros físico-químicos, funcionais e de viabilidade.	(Ramos, 2020).

<p>polpa de grumixama, inulina e whey protein.</p>		<p>pH; Umidade; Compostos Fenólicos Totais; Atividade Antioxidante.</p>	<p>cultura microbiana do <i>Lactobacillus acidophilus</i>, restante água potável. Formulação 2: Adicionada de 2% de whey protein. Formulação 3: Adicionada de 1% de inulina Formulação 4: Adicionada de 2% de whey protein, 1% de inulina.</p>	<p>Todas as formulações apresentaram viabilidade probiótica acima de 10⁷ UFC/mL.</p>	
<p>Bebida probiótica Suco de Cajú</p>	<p><i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442</p>	<p>Contagem de BAL; Açúcares; Teor de ácido láctico; Vitamina C; Cor; Compostos Fenólicos Totais; Atividade Antioxidante; pH; Atividade Enzimática; Avaliação Sensorial.</p>	<p>Após a fermentação, o suco foi dividido em duas partes. Adicionado de Açúcar de mesa (8% p / v), amostras de suco de caju probiótico adoçado e não adoçado (80 ml)</p>	<p>Sob refrigeração durante 42 dias o suco se manteve estável e com aumento da viabilidade na amostra adoçada; A fermentação conservou a atividade antioxidante e o teor de ácido ascórbico do suco quando comparado ao não fermentado.</p>	<p>(Pereira, 2013)</p>

Bebida probiótica de suco de uva	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> LR-04	Contagem de BAL; pH; Atividade antioxidante (FRAP), (ORAC) e (DPPH);	Suco uva orgânica 50% v/v, suplementado com 3% m/v de farinha de casca de uva, 7,5% de sacarose e água destilada, pH ajustado para 5,5 com Carbonato de Cálcio.	Apresentou viabilidade e estabilidade celular; Processo fermentativo continuou mesmo após refrigeração sob 4°C, houve redução do pH, Aumento da atividade antioxidante após a fermentação; Determinação do processo fermentativo 37°C/ 18h.	(Balthar, 2022)
Bebida de soja fermentada	<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i> BB-12 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Determinação de sólidos solúveis °Brix; pH; Acidez total titulável; Umidade; Análise de açúcares (CLAE); Contagem de BAL; Qualidade Higiênico-Sanitária;	0, 3 e 6% (m/m) de açúcar refinado, 6% (m/v) de extrato de soja em pó (Olivebra Industrial S.A, extrato de soja em pó provesol SM-N), 1,2% de fosfato tricálcico e 2% de sorbato de potássio e água potável.	<i>Bifidobacterium animalis</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> tiveram uma boa multiplicação na bebida, inclusive na de 0% sacarose; O tempo de armazenamento não teve um efeito significativo no pH, mas mostrou uma diferença significativa no teor de sacarose.	(Leal, 2017)

2.2.1 Viabilidade dos probióticos em bebidas

As bebidas *plant-based* probióticas devem apresentar características sensoriais adequadas, número mínimo de probióticos viáveis recomendado e alto teor de substâncias benéficas na nutrição humana. No entanto, a matriz alimentar é significativamente alterada durante a fermentação devido à produção de ácidos, compostos voláteis e outras transformações que alteram as características sensoriais da bebida (Baú *et al.*, 2023).

A concentração de probióticos necessária para obter um efeito clínico é frequentemente citada como $\geq 10^6$ UFC/mL no intestino delgado e $\geq 10^8$ UFC/g no cólon. A dose para tratamento de uma doença aguda por um determinado agente probiótico pode ser inferior ou superior, na ordem de 10 vezes ou 100 vezes ou mais em termos de unidades formadoras de colônias (UFC) (Minelli; Benini, 2008). Entretanto, fatores como pH, acidez, temperatura, teor de açúcares, presença de outros micro-organismos inibidores pode afetar a viabilidade dos probióticos.

Deziderio (2019) desenvolveu bebidas vegetais fermentadas a base de aveia, amêndoas, soja, castanha-do-brasil e arroz. Neste estudo, um grupo de bebidas foi adicionado e padronizado a 4,0 °Brix de sacarose, enquanto o segundo grupo foi formulado somente com os extratos vegetais. De acordo com este estudo, concluiu-se que a adição da sacarose nas bebidas não influenciou a taxa de desenvolvimento e estabilidade das BAL, porém os extratos com ajuste de sólidos solúveis a 4,0 °Brix obtiveram características físico-químicas diferentes quando comparado aos extratos sem ajuste. As bebidas vegetais foram comparadas com a bebida controle (produzida com leite de vaca), e na análise de pH observou-se que as bebidas adicionadas de sacarose (castanha-do-brasil e amêndoas) foram as que mais se assemelham ao pH da bebida controle que foi de 4,26 após 12h de fermentação, sendo respectivamente o pH da bebidas vegetais de 4,23 e 4,24.

Leal (2017) elaborou uma bebida vegetal formulada a partir de 6% (m/v) de extrato de soja em pó, 1,2% de fosfato tricálcico e 2% de sorbato de potássio, água potável e açúcar refinado nas concentrações de 0, 3 e 6% (m/m). A bebida foi fermentada com *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12 e *Lactobacillus acidophilus* La-05. Neste estudo observou-se também que independentemente da quantidade de sacarose, *B. animalis* e *L. acidophilus* tiveram uma boa multiplicação na bebida de soja, inclusive na proporção de 0%, com viabilidade probiótica entre 10^6 e 10^9 UFC/mL mesmo após 30 dias de prateleira. Na análise dos açúcares determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, a sacarose, assim como o oligossacarídeo estaquiose, foi consumida proporcionalmente à sua concentração é utilizada como substrato

pelas BAL durante a fermentação. A rafinose não foi detectada antes da fermentação, e os açúcares, frutose e glicose foram quantificados nas bebidas após a fermentação devido a quebra dos açúcares. Para o pH o tempo de armazenamento (30 dias) das bebidas não teve um impacto significativo, no entanto, o tempo de armazenamento interagiu com os processamentos e com a quantidade de sacarose adicionada, fazendo com que essas sim tivessem alterações significativas.

Yoon *et al.* (2005) avaliaram a viabilidade de produção de suco de beterraba esterilizado e fermentado, utilizando as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus plantarum*. Como resultado, foi verificado que *L. acidophilus* e *L. plantarum* foram mais eficientes na redução do pH do suco (para valores inferiores a 4,5, a partir de valor inicial de 6,3) durante a fermentação. Entretanto, o *L. plantarum* revelou-se mais resistente à estocagem em temperatura de 4°C durante quatro semanas (10^6 - 10^8 UFC/mL de produto). Outro experimento com suco de cenoura fermentado por *L. plantarum* revelou ser mais resistente a estocagem em temperatura de 4°C demonstraram populações de 10^7 UFC/mL, ao final da vida de prateleira do produto, caracterizando-o com uma bebida vegetal probiótica (Yoon *et al.*, 2006).

Além do teor de sacarose e tipo de micro-organismo, a temperatura é um fator que também afeta o processamento de alimentos probióticos. Conforme Saad *et al.* (2011), as baixas temperaturas empregadas no congelamento e/ou refrigeração, visando a conservação do produto, também poderiam ser um fator limitante no desenvolvimento de bebidas probióticas. Essas temperaturas poderiam levar, também, à redução da carga microbiana e/ou perda da viabilidade pelos micro-organismos. Entretanto, diversos estudos demonstram que a manutenção de bebidas probióticas em temperaturas de 4°C, refrigeradas, pode ser uma alternativa para elaboração de sucos e/ou néctares probióticos. Do ponto de vista da qualidade sensorial da bebida, a manutenção sob baixas temperaturas é interessante, pois com a redução da temperatura, reduz-se, também, a atividade metabólica dos micro-organismos probióticos.

A temperatura de estocagem e o teor de sacarose também podem afetar a viabilidade dos probióticos. De acordo com Saarela *et al.* (2006), em experimentos com suco de laranja, de uva e de maracujá, adicionados de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e sacarose verificaram que a viabilidade do micro-organismo foi maior no suco estocado a 4°C do que naquele estocado a 20°C e que a sacarose funcionou bem como crioprotetor em sucos de frutas. Chou e Hou (2000), pesquisaram a viabilidade de duas espécies de *Bifidobacterium* em uma bebida fermentada de soja adicionada de sacarose e armazenada sob temperatura ambiente a 5°C.

Como resultado, as populações de *B.longum* foram menos resistentes durante o período de estocagem, quando comparadas com as *B. infantis*. O armazenamento das bebidas a temperatura ambiente foi mais letal para os micro-organismos do que o armazenamento sob refrigeração, a adição de sacarose aumentou a viabilidade celular a temperatura ambiente, em especial para *B. infantis*.

2.2.2 Biotransformações em bebidas probióticas

O uso de micro-organismos probióticos na fermentação de bebidas *plant-based* é um processo que representa não apenas uma estratégia para preservação de alimentos, mas também uma forma eficiente para elevar a diversidade de nutrientes e propriedades bioativas (Zhong *et al.*, 2021). Estudos revelam (Tabela 1) que as propriedades das bebidas são alteradas durante a fermentação, podendo aumentar ou reduzir o teor de compostos com propriedades terapêuticas. Neste contexto, fermentar o extrato aquoso de hibisco e soja com bactérias probióticas é uma alternativa que atende aos desafios atuais no desenvolvimento de novos produtos.

Um estudo elaborou bebidas fermentadas de cajá com *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, utilizaram delineamento composto central 2^2 para otimizar as condições de pH e temperatura empregadas no processo de fermentação, sendo consideradas ideais para a elaboração da bebida probiótica 16 horas de fermentação e pH inicial de 6,4, e a temperatura empregada no processo fermentativo foi de 30°C. Avaliou-se também a concentração de compostos fenólicos totais da bebida não fermentada e após as 16h de fermentação, através método Folin-Ciocalteu, observou-se que o suco não fermentado apresentou concentração de 609,3 µg EAG/mL, enquanto a bebida fermentada por 16 h apresentou 123,20 EAG/mL. Foi observado diminuição dos compostos fenólicos após o processo fermentativo, propõe-se também que o ajuste do pH antes da fermentação esteja relacionada às modificações dos compostos e conseqüentemente a sua diminuição. A atividade antioxidante foi determinada pelo sequestro dos radicais livres, de DPPH 3,28 µmol TE/mL e ABTS 3,56 µmol TE/mL, que também foi maior na amostra não fermentadas, enquanto a atividade máxima nas amostras fermentadas foi de 0,38 µmol TE/mL para DPPH e 2,87 µmol TE/mL para ABTS. O suco apresentou viabilidade celular e estabilidade durante os 28 dias armazenados sob refrigeração a 4°C, e contagem de 8,7 Log UFC/mL da bebida probiótica (Ribeiro, 2019).

Hashemi (2017) utilizou suco de limão doce na produção de uma bebida probiótica com adição de *Lactobacillus plantarum* LS5. A viabilidade das células aumentou durante o processo

de fermentativo com condições empregadas em estufa a 37°C por 48 horas, chegando a $8,63 \pm 0,38$ log UFC/mL, após o tempo de 28 dias armazenado a 4°C a viabilidade diminui para $7,14 \pm 0,21$ log UFC/mL, mantendo a viabilidade probiótica da bebida fermentada. Observou-se também que o suco apresentou atividade antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Logo após a fermentação houve um aumento do pH, concentração de ácido láctico e da capacidade antioxidante da bebida, enquanto diminuem as concentrações de glicose e frutose, ácido cítrico, acidez total e compostos fenólicos. Durante o armazenamento houve diminuição dos compostos fenólicos e antioxidantes nas amostras fermentadas e não fermentadas, o ácido ascórbico quando comparado apresentou-se mais estável no suco fermentado.

Balthar (2022) elaborou uma bebida probiótica com suco de uva orgânica, suplementada com farinha de casca de uva e sacarose, fermentada com cepas de *Lactobacillus rhamnosus* LR04, a bebida foi fermentada por 18 h/ 37°C, sendo avaliada antes e depois do processo fermentativo, e acompanhada durante 45 dias de armazenamento sob refrigeração de 4°C. Além do produto apresentar viabilidade celular e estabilidade no período acompanhado, nas análises realizadas pelo método de DPPH e FRAP, observou-se um aumento na capacidade antioxidante das bebidas após o processo fermentativo, sendo que o ensaio de DPPH apresentou o aumento de 60% da capacidade antioxidante da amostra fermentada, quando comparada com a amostra não fermentada, 97,08 para 164,56 mM trolox mL⁻¹. O maior valor encontrado para atividade antioxidante foi no 7º dia de armazenamento, 289,46 mM trolox mL⁻¹. A capacidade antioxidante pelo método de FRAP (Potencial Antioxidante Redutor do Ferro), também aumentou após o processo fermentativo, de 21,72 para 27,61 mM sulfato ferroso mL⁻¹. O valor máximo da capacidade antioxidante encontrado pelo método de FRAP assim como o de DPPH, foi no 7º dia sob refrigeração após o processo fermentativo, 34,36 mM sulfato ferroso mL⁻¹. Estes dados indicam que o suco de uva probiótico apresenta uma maior capacidade antioxidante quando comparado ao suco de uva não fermentado.

As biotransformações revelam a necessidade de avaliar os parâmetros de processamento das bebidas *plant-based*, especialmente do processo fermentativo, que podem afetar as características físico-químicas e funcionais da bebida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma bebida probiótica *plant-based* de extrato de hibisco e soja e avaliar o efeito dos parâmetros de processamento sobre as características físico-químicas e funcionais.

3.2 Objetivos específicos

- Elaborar uma bebida *plant-based* de extrato de hibisco e soja, utilizando o probiótico *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1.
- Avaliar o efeito da temperatura de fermentação e teor de sacarose nas propriedades da bebida probiótica de hibisco, utilizando um planejamento fatorial 3².
- Determinar o teor de antocianinas monoméricas, viabilidade celular do probiótico, pH e acidez das bebidas probióticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima e ingredientes

Para elaboração da bebida foi obtido o extrato de hibisco, utilizando cálices de hibisco (*H. sabdariffa* L.) desidratados adquiridos comercialmente (Prima Frutta) que foram armazenados em embalagens a vácuo sob refrigeração 4 °C, extrato hidrossolúvel de soja comercial sem a adição de açúcares da marca Ades, e sacarose comercial.

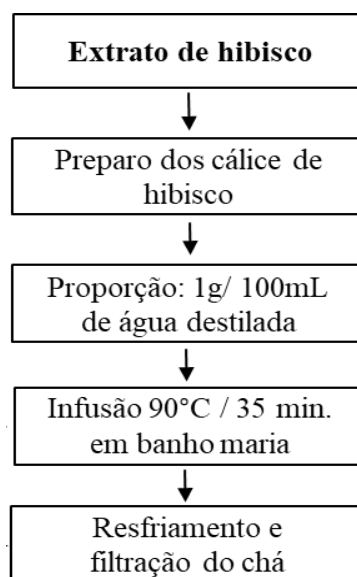
A cepa utilizada como cultura probiótica foi *Lacticaseibacillus paracasei* LYOFAST BGP 1 adquirida comercialmente da empresa Clerici-Sacco[®], Brasil. A cultura liofilizada foi mantida na embalagem original, sob congelamento.

4.2 Desenvolvimento da bebida *plant-based* probiótica

4.2.1 Elaboração do extrato de hibisco

Na elaboração do extrato de hibisco foram utilizados cálices desidratados e homogeneizados, moídos em moinho analítico (Marca IKA - Modelo A11 Basic 2900000) por aproximadamente 30 segundos. Na infusão foi utilizada a proporção de 1g de hibisco triturado para cada 100 mL de água destilada aquecida ~ 90 °C, e o extrato obtido por infusão em banho-maria a 90 °C por 25 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo e posteriormente a formulação das bebidas. A Figura 5 apresenta o fluxograma de elaboração do extrato de hibisco.

Figura 5 – Preparo do extrato aquoso de hibisco



Fonte: Autoria própria (2023).

4.2.2 Formulação da bebida *plant-based* probiótica

A formulação geral da bebida *plant-based* probiótica está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Formulação geral da bebida *plant-based*

Ingredientes	%
Extrato de hibisco	60
Extrato de soja Ades	30
Sacarose e/ou água*	10

* Conforme planejamento fatorial 3² (Tabela 2).

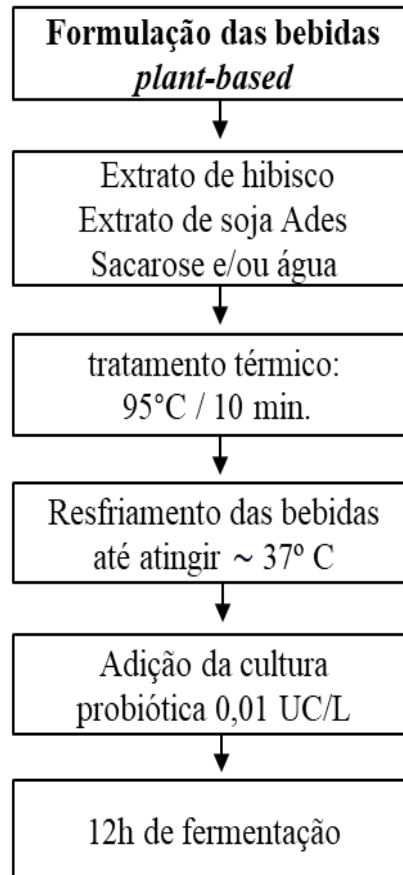
Fonte: Autoria própria (2023).

Para a formulação da bebida foi utilizado 60% de extrato aquoso de hibisco, 30% de extrato hidrossolúvel de soja comercial sem adição de açúcares e 3 diferentes percentuais de sacarose que variam de 2, 6 ou 10%, conforme planejamento fatorial (item 4.2.3), com adição de água destilada de 8, 4 ou 0%, respectivamente com objetivo de completar 100% da formulação. A bebida foi adicionada da cepa probiótica *L. paracasei* BGP1, na concentração de 0,01 UC/L (Unidade de Contagem/ Litro).

4.2.3 Planejamento fatorial e desenvolvimento da bebida

A elaboração da bebida foi realizada conforme o fluxograma apresentado na figura 6.

Figura 6 – Fluxograma de elaboração da bebida *plant-based*



Fonte: Autoria própria (2023).

Seguindo o planejamento fatorial 3^2 (Tabelas 3 e 4), foram formuladas bebidas com 150 mL, sendo inicialmente pesadas as quantidades de sacarose conforme o planejamento, posteriormente adicionadas de água até completar 10% da formulação se necessário, depois adicionadas de extrato de hibisco e extrato hidrossolúvel de soja com proporções fixas de 60 e 30%, respectivamente. Os ingredientes foram adicionadas em frascos de vidros esterilizados e submetidos a tratamento térmico de 95°C por 10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo até atingir temperatura ambiente, para então serem adicionadas da cultura probiótica na concentração inicial estimada de 0,01 UC/L, que corresponde ao peso de 0,024g de cultura

probiótica liofilizada (a unidade de medida utilizada é a indicada pelo fabricante no rótulo da embalagem). Foram empregadas 12 horas fixas de fermentação em diferentes condições de temperatura 27, 37 e 47°C. A fermentação da bebida probiótica em diferentes temperaturas teve como objetivo explorar os efeitos nas características da bebida, tendo em vista que a alteração da temperatura de fermentação modifica o ambiente em que os micro-organismos realizam suas reações bioquímicas, as biotransformações que ocorrem durante o processo de fermentação podem ser influenciadas, bem como suas características físico-químicas. Portanto, fermentar em diferentes temperaturas teve como objetivo explorar a adaptação do micro-organismo a diferentes variações térmicas, compreendendo o impacto dessas variações nas biotransformações e obtendo informações relevantes para aplicações práticas para as indústrias de alimentos.

Foi utilizado o planejamento fatorial 3^2 , com o intuito de investigar os possíveis efeitos do teor de sacarose e temperatura de incubação nas características das bebidas. Neste planejamento foram realizados 11 ensaios, sendo três repetições no ponto central (ensaios 5, 10 e 11), conforme a Tabela 4. A realização dos ensaios ocorreu de forma aleatória.

Tabela 4 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial 3² para elaboração de bebida *plant-based*

Ensaio	Variáveis independentes			
	Codificadas		Decodificadas	
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
1	-1	-1	2 %	27 °C
2	-1	0	2 %	37 °C
3	-1	1	2 %	47 °C
4	0	-1	6 %	27 °C
5	0	0	6 %	37 °C
6	0	1	6 %	47 °C
7	1	-1	10 %	27 °C
8	1	0	10 %	37 °C
9	1	1	10 %	47 °C
10	0	0	6 %	37 °C
11	0	0	6 %	37 °C

*x₁ e x₂ são os níveis codificados das variáveis independentes (X₁ Sacarose) e (X₂ Temperatura em °C).
Fonte: Autoria própria (2023).

Foram avaliadas as seguintes funções respostas nos produtos fermentados: acidez (Y₁), pH (Y₂), teor de antocianinas monoméricas (Y₃), e contagem de *L. paracasei* (Y₄).

A análise de variância (ANOVA) da regressão e coeficiente de determinação (R²) foram realizados para verificar o ajuste do modelo aos dados experimentais. As funções respostas foram ajustadas conforme o modelo: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + e$ (Equação 1), onde, Y= função resposta, x₁ e x₂ = níveis das variáveis codificadas, β = coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta e e= erro puro. Para análise de regressão e variância e superfície de resposta utilizou-se o software *Statistica Academic Ultimate* (Statsoft, 2021).

4.3 Procedimento analíticos

4.3.1 pH

A análise de pH foi realizada após as 12 horas de fermentação, por meio de leitura em potenciômetro (marca TECNOPON modelo mPA- 210) calibrado com solução tampão pH 4,0 e pH 7,0 conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

4.3.2 Acidez total titulável

Na determinação da acidez total utilizou-se o método de titulação potenciométrica descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), onde foram diluídos 10 mL de amostra em 100 mL de água destilada, titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M padronizado com pHmetro (marca TECNOPON modelo mPA- 210) e sob agitação eletromagnética (marca SOLAB modelo SL-91) até atingir o pH de 8,3. O método tem como princípio a neutralização do ácido presente na amostra pela solução base (NaOH 0,1 M) sendo utilizado potenciômetro durante a titulação com aumento gradual do pH até atingir pH de 8,3 que indica o ponto de equivalência da titulação, o resultado é expresso em gramas de ácido láctico por 100 mL de amostra (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

O cálculo utilizado para a determinação da acidez é descrita pela equação abaixo:

$$g AL / 100 mL = \frac{n * f * 0,9}{V}$$

Sendo que:

n: volume em mL de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação;

f: fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

0,9: fator de conversão para o ácido láctico;

V: volume da amostra.

4.3.3 Determinação de antocianinas monoméricas

A análise de antocianinas monoméricas foi determinada pelo método de pH diferencial conforme metodologia descrita por AOAC (2005), sendo a absorvância analisada em espectrofotômetro (marca QUIMIS - modelo Q898U2M5, São Paulo, Brasil) realizada a 517 e 700 nm. De acordo com o método, as antocianinas são pigmentos que sofrem mudanças de cor reversíveis em diferentes pHs. Em pH 1,0, elas se encontram na forma de oxônio colorido, enquanto em pH 4,5, estão na forma de hemiacetal descolorido. Essas mudanças de coloração podem ser quantificadas por meio da diferença de absorvância em espectrofotômetro. A diferença de absorvância dos pigmentos a 517 nm é proporcional à concentração do pigmento. Os resultados foram expressos com base na antocianina delphinidina 3-sambubiosídeo. As antocianinas degradadas na forma polimérica não são incluídas nas medições, pois são resistentes à mudança de cor, independentemente do pH, e absorvem tanto em pH 4,5 quanto em pH 1,0 (Lee; Durst e Wrolstad, 2005).

Em tubos de ensaio, foram adicionados separadamente 7 mL de solução tampão de cloreto de potássio 0,025 M pH 1,0 e a solução tampão de acetato de sódio 0,4 M pH 4,5, em seguida, foi adicionado 3 mL da amostra em cada tubo. Os tubos foram agitados em vórtex e colocados em um ambiente livre de luz, por um período de 20 minutos, logo após isso, as amostras foram transferidas para frascos de eppendorf e os frascos centrifugados em uma centrífuga refrigerada (marca PHD – modelo HR/T16M) a 10.000 rpm por 10 minutos, após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para a análise em espectrofotômetro nos diferentes níveis de absorvância. A análise foi realizada dentro do prazo de 20 a 50 minutos, pois esse é o intervalo em que ocorre a reação e evita-se a degradação das antocianinas.

A fórmula utilizada para o cálculo da concentração de antocianinas é representada pela equação abaixo:

$$\text{Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A * MW * DF * 10^3}{(\epsilon * 1)}$$

Onde:

MW é a massa molecular para delphinidina 3-sambubiosídeo (597,14 g/mol);

DF é o fator de diluição da amostra;

ϵ é a absorvância molar da delphinidina 3-sambubiosídeo (26000 L/mol.cm);

10^3 é o fator de conversão de grama para miligrama;

A é calculado pela seguinte fórmula apresentada pela equação abaixo:

$$A = (Abs\ 520 - Abs\ 700)_{pH\ 1,0} - (Abs\ 520 - Abs\ 700)_{pH\ 4,5}$$

4.3.4 Viabilidade celular

A contagem de *L. paracasei* BGP 1, foi realizada em duplicata, pela técnica de contagem em placa por semeadura em profundidade com ágar MRS, com incubação a 37°C por 72 horas em jarra anaeróbia de PVC com indicador de CO₂. As amostras foram diluídas em série, em solução de água peptonada 1% e homogeneizadas em agitador vortex mixer por 30 segundos, sendo inoculadas em ágar MRS 1 mL das amostras e incubadas em anaerobiose a 37°C/72 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/ mL (IRIGOYEN *et al.*, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do teor de sacarose e temperatura de fermentação nas propriedades da bebida *plant-based* de extrato de hibisco e soja

O efeito do teor de sacarose (X_1 : 2, 6 e 10%) e temperatura (X_2 : 27, 37 e 47 °C) de fermentação de bebidas *plant-based* foi avaliado, e os resultados obtidos para as funções-resposta pH, acidez, contagem de *L. paracasei* e teor de antocianinas está apresentado na Tabela 5. As funções-resposta foram submetidas a análise de variância, e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 5 - Resultados para as funções respostas pH, acidez, contagem de *L. paracasei* e teor de antocianinas

Ensaio	Funções-resposta			
	pH	Acidez (g/100mL)	Antocianinas (mg/L)	Contagem de <i>L. paracasei</i> (log UFC/mL)
1	5,95	0,06	21,74	8,22
2	5,20	0,13	5,93	9,00
3	6,05	0,05	17,19	6,74
4	5,60	0,06	13,21	8,68
5	4,85	0,17	4,67	9,49
6	5,90	0,05	5,78	7,03
7	5,50	0,06	10,60	8,57
8	4,40	0,22	5,97	9,17
9	5,75	0,06	4,82	7,18
10	4,90	0,16	6,16	9,34
11	4,70	0,17	12,40	9,31

Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 6 - Análise Variância (ANOVA) do modelo obtido pela aplicação da metodologia de superfície de resposta aos dados experimentais.

FATOR	SS	df	MS	F	P
y₁ = Análise de pH					
Sacarose (%) L (x ₁)	0,400417	1	0,400417	28,5284	0,001074
Temperatura(°C) L+Q (x ₂)	2,698606	2	1,349303	96,1335	0,000008
Error	0,098250	7	0,14036		
y₂ = Teor de acidez					
Sacarose (%) L (x ₁)	0,001667	1	0,001667	5,0000	0,055767
Temperatura (°C) Q (x ₂)	0,035030	1	0,035030	105,0909	0,000007
Error	0,0002667	8	0,000333		
y₃ = Teor de antocianinas					
Sacarose (%) L (x ₁)	91,8068	1	91,80682	20,72358	0,003882
Temperatura (°C) L+Q (x ₂)	162,3785	2	81,18924	18,32687	0,002783
1*2	46,3740	1	46,37401	10,46802	0,017789
Error	26,5804	6	4,43006		
y₄ = Contagem de <i>L. paracasei</i>					
Sacarose (%) L+Q (x ₁)	0,29132	2	0,145659	14,1811	0,005324
Temperatura (°C) L+Q (x ₂)	8,82851	2	4,414253	429,7638	0,000000
Error	0,06163	6	0,010271		

x₁ e x₂ são os níveis codificados de X1 (Sacarose %) e X2 (Temperatura °C) variáveis independentes. SS= soma dos quadrados. df = graus de liberdade. MS = quadrados médios. Valor de P = significativo abaixo de 0,05.

Fonte: Autoria própria (2023).

5.2 pH e acidez

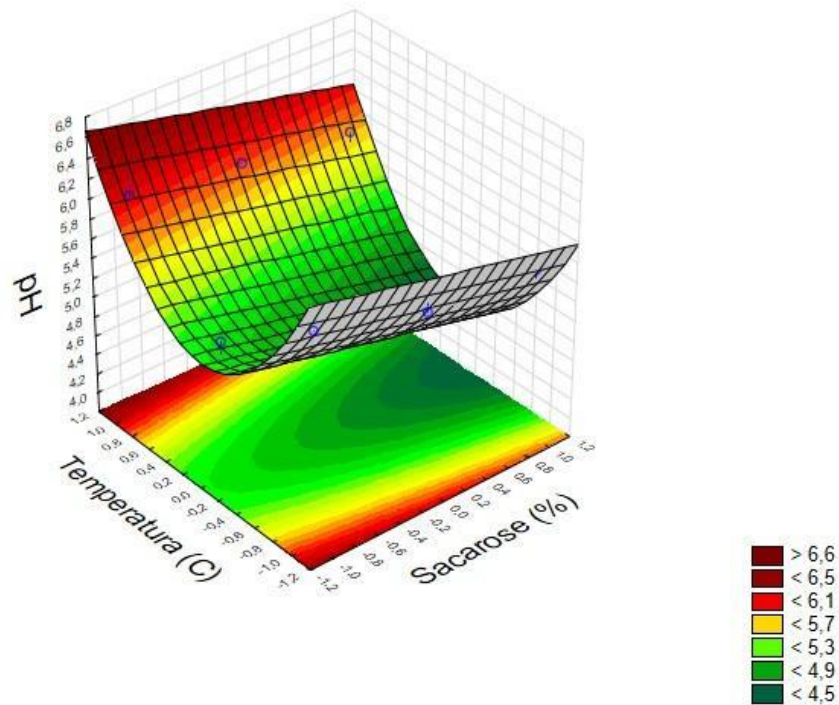
O pH (y₁) das bebidas *plant-based* de extrato de hibisco e soja variou de 4,4 a 6,05, conforme dados contidos na Tabela 5. O modelo utilizado para estimar o pH pode ser descrito como $y_1 = 5,46 - 0,26.x_1 + 0,11.x_2 - 0,5.x_2^2$. A função-resposta pH, apresentou coeficiente de determinação (R²) de 0,96, evidenciando que o modelo se ajustou de forma adequada aos dados experimentais. Os termos representados pela sacarose (linear; x₁) e temperatura (quadrática; x₂²) foram significativos, conforme dados da Tabela 6. O termo atribuído a temperatura (linear; x₂) não apresentou significância, porém foi mantido pois contribui com o valor obtido do R².

No gráfico de superfície de resposta (Figura 7) observou-se que, quando a bebida probiótica *plant-based* foi fermentada com um teor maior de sacarose ($x_1:1$; $X_1:10\%$) e temperatura no ponto central ($x_2:0$; $X_2:37^\circ\text{C}$), houve maior diminuição do pH (4,5). A diminuição do pH representa uma maior atividade metabólica do *L. paracasei*, já que durante o processo fermentativo há um aumento na produção de ácido lático, que resulta em maior acidez e conseqüentemente diminuição do pH.

O modelo utilizado para estimar o teor de acidez (y_2) da bebida pode ser descrito como $y_2 = 0,094 + 0,02 \cdot x_1 + 0,06 \cdot x_2^2$. A função-resposta teor de acidez, apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,93, evidenciando que o modelo se ajustou de forma adequada aos dados experimentais. Somente o termo quadrático da temperatura de fermentação (x_2^2) foi significativo, entretanto, o teor linear da variável x_1 foi mantido devido a sua contribuição no ajuste do modelo matemático. O teor de acidez da bebida variou de 0,05 a 0,22 g/100 mL de ácido lático, conforme os dados apresentados na Tabela 5. O ensaio 8 formulado com ($x_1 : 1$) 10 % de sacarose e fermentado a 37°C ($x_2 : 0$) foi o que apresentou maior índice de acidez, conseqüentemente maior atividade probiótica. Para este parâmetro avaliado a temperatura de fermentação influenciou consideravelmente, o que era esperado tendo em vista que o micro-organismo probiótico utilizado no processo fermentativo tem como condição ótima de crescimento temperaturas próximas a 37°C .

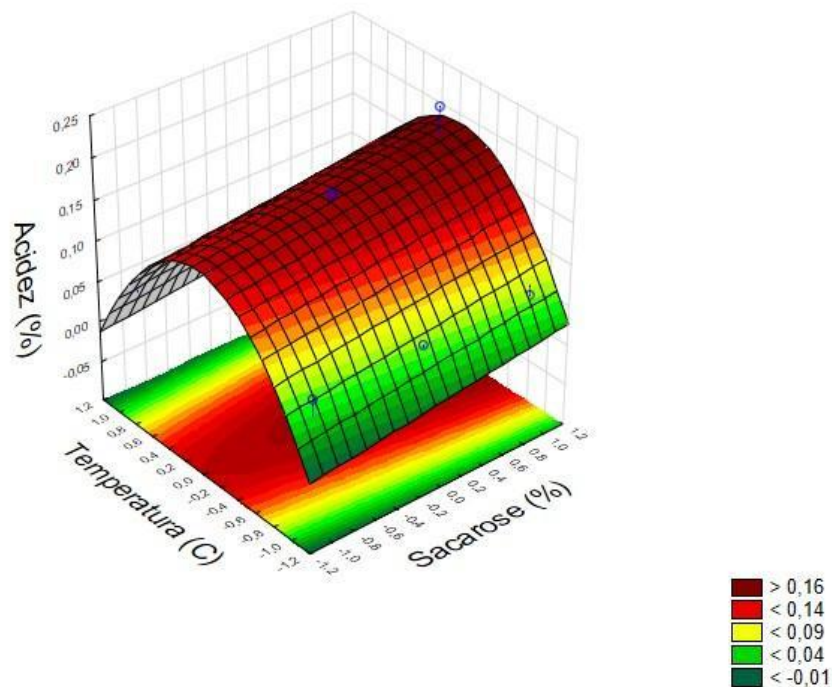
O gráfico de superfície de resposta representado pela Figura 8 confirma que a bebida probiótica *plant-based* fermentada com um teor maior de sacarose ($x_1: 1$; $X_1: 10\%$) e temperatura no ponto central ($x_2: 0$; $X_2: 37^\circ\text{C}$), apresenta uma maior acidez (0,22 g AL/100mL), coincidindo com os dados apresentados na Figura 7, que apresenta um menor pH para estas condições de fermentação. A acidez elevada e um baixo valor de pH justificam uma maior atividade metabólica dos micro-organismos, que produzem ácido lático que contribui para a alteração destes parâmetros.

Figura 7 - Superfície de resposta gerada para o pH, em função do percentual de sacarose (x_1) e da temperatura de fermentação (x_2) da bebida probiótica *plant-based*, $x_1 = -1$ (2%), 0 (6%) e +1 (10%); $x_2 = -1$ (27 °C), 0 (37 °C) e +1 (47 °C).



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 8 - Superfície de resposta gerada para a acidez, em função do percentual de sacarose (x_1) e da temperatura de fermentação (x_2) da bebida probiótica *plant-based*, $x_1 = -1$ (2%), 0 (6%) e +1 (10%); $x_2 = -1$ (27 °C), 0 (37 °C) e +1 (47 °C).



Fonte: Autoria própria (2023).

Um estudo elaborado por Marin *et al.* (2014) formulou uma bebida fermentada com *Lactobacillus acidophilus* (LA – NCFM) de soja (50%) e lactossoro (50%), adicionadas de 2,5% de sacarose e 5% de frutooligossacarídeos, com e sem adição de mel (10%), os autores definiram como valor de referência e corte de fermentação (42°C) o pH de 4,5, atingido após 6 horas de fermentação, esse pH é considerado adequado para bebidas à base de extrato de soja, pois ocorre a formação de gel e coagulação das proteínas na bebida, para acidez as bebidas apresentaram 0,46 (sem adição de mel) e 0,54% ácido lático (adicionada de mel), os autores relatam que a adição de mel por conter alto teor de carboidratos fermentescíveis aumenta a concentração de ácido lático.

Jesus (2022) também desenvolveu uma bebida vegetal à base de soja com adição de 3% sacarose e 3% de inulina, fermentada com *Lactobacillus paracasei* BGP 1, considerando o pH de 4,6 como o ponto de corte e interrupção do processo fermentativo, que foi atingido após 6 horas de fermentação a 37°C.

Pereira (2009) afirma que pH menor que 4 torna o produto muito ácido, além de precipitar as proteínas, enquanto um pH superior a 4,5 prejudica a conservação da bebida, além dos efeitos sensoriais, pois o ácido lático é o principal composto desenvolvido pelos micro-organismos durante o processo fermentativo, que proporciona o sabor característico das bebidas fermentadas.

Os micro-organismos probióticos possuem maior tolerância a índices maiores de acidez e sobrevivem melhor a pH iguais a 5 ou inferiores, o que garante uma maior vantagem em relação a viabilidade e competitividade exercida sobre outros grupos de bactérias, principalmente as deteriorantes, que tem dificuldade para se desenvolver em condições de maior acidez (Hofvendahl; Hägerdal-Hahn, 2000). É fundamental o controle do pH no processo fermentativo, pois é um fator determinante na conservação do produto bem como na viabilidade das bactérias probióticas, que em condições elevadas de acidez podem não apresentar viabilidade celular necessária para obter os efeitos benéficos à saúde.

Santos (2020) elaborou bebidas de grão-de-bico e coco fermentadas com *L. paracasei* LBC 81 (37°C por 9 horas), variando os teores de açúcares (0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%). O autor definiu um intervalo de pH final entre 4,5 e 4,8 como critério para o término da fermentação. Observou-se que a formulação sem açúcares demandou 9 horas para atingir o pH final de 4,84, enquanto a bebida com 10% de açúcares alcançou esse critério em apenas 6 horas, atingindo um pH de 4,52. Essa variação nos tempos de fermentação é diretamente atribuída à

influência dos teores de açúcar, destacando a relevância desses elementos na regulação do pH final das bebidas fermentadas.

Lopes (2008) resume que os probióticos produzem ácido láctico em seu metabolismo durante o processo fermentativo dos carboidratos, a fermentação é um processo anaeróbico que ocorre sem a presença de oxigênio, onde a partir de um mol de glicose originam-se como subproduto dois mols de ácido láctico. Os carboidratos, açúcares simples (monossacarídeos e dissacarídeos) por serem mais disponíveis, são rapidamente metabolizados pelos microorganismos, promovendo o aumento do índice de acidez e a diminuição do pH.

Deziderio (2019) obteve valores de acidez próximos de 0,27 a 0,33 g de ácido láctico/100 mL em bebidas fermentadas de amêndoas, castanhas do brasil e soja, as culturas utilizadas foram de *Bifidobacterium* BB-12, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* LA-5. O extrato de soja puro fermentado apresentou acidez de 0,27 g de ácido láctico/100mL. O estudo ainda avaliou os extratos de arroz e aveia, com ou sem adição de sólidos solúveis, onde obteve valores de 0,02 a 0,16g de ácido láctico/100mL, resultando nos menores valores de acidez encontrados.

Fatores que podem estar relacionados a diferença no índice de acidez são as características físico-químicas da matriz utilizada, a quantidade de substrato disponível para o processo fermentativo dos probióticos e a cepa utilizada. Em comparação, os estudos que foram adicionados de prebióticos e açúcares, possuem índice maiores de acidez devido a presença destes carboidratos mais simples. Os valores obtidos por Deziderio foram os mais próximos dos resultados do presente estudo onde se obteve de 0,05 a 0,22 g/100 mL de ácido láctico.

Um estudo realizado por Da Silva *et al.* (2023) analisou bebida fermentada de extrato hidrossolúvel de soja com sabor ameixa, adicionadas de fermento láctico (*Bifidobacterium* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, e *Streptococcus thermophilus*) a bebida adicionada com goma guar obteve de acidez 0,67, a acrescentada com goma gelana teve 0,64 de acidez e a acrescentada de goma CMC alcançou 0,68 de acidez (g/100 g de ácido láctico).

Os resultados obtidos nos estudos realizados por diferentes pesquisadores variaram de 0,02 a 0,67 g de ácido láctico/100mL. Essa variação pode ser atribuída à escolha de microorganismos distintos em cada pesquisa para conduzir o processo de fermentação. Além disso, fatores como as características físico-químicas das matrizes utilizadas, bem como seu potencial prebiótico, a temperatura empregada durante a fermentação, a quantidade de substrato disponível para serem metabolizados desempenham papéis cruciais no índice de acidez das bebidas fermentadas. Além de afetar diretamente o metabolismo microbiano, esses elementos

influenciam a quantidade e a velocidade de formação de ácido lático gerado durante o processo fermentativo, contribuindo para a diversidade nos resultados encontrados nos estudos.

Deziderio (2019), ao formular bebidas vegetais, padronizou os produtos (soja, amêndoas, aveia, arroz) com o teor de sólidos de 4,0 °Brix. Esse ajuste de sólidos solúveis totais, contribuiu para a diminuição do pH, tendo em vista que o aumento da concentração de carboidratos propõe um aumento no substrato disponível para reações metabólicas dos micro-organismos fermentadores e produtores de ácido lático. Este comportamento é similar ao observado neste estudo, em que condições experimentais com maior teor de sacarose promoveram maior resposta no metabolismo microbiano.

Leal (2017) avaliou concentrações de 0, 3 e 6% de açúcar refinado na bebida de soja fermentada, realizou análises de detecção por cromatografia líquida de alta eficiência e constatou a presença de frutose e glicose após a fermentação, devido a quebra dos açúcares. Além de seu consumo ser proporcional a sua concentração inicial, a quantidade de açúcar adicionada e o tempo de armazenamento promoveram alterações significativas no pH.

Um estudo realizado por Cui e Qu (2021) avaliou o metabolismo de carboidratos prebióticos em bactérias lácticas, eles apresentam as cepas *Lacticaseibacillus casei* e *Lacticaseibacillus paracasei* como micro-organismos com maior capacidade de metabolizar especialmente prebióticos e carboidratos (frutooligossacarídeo, galactooligossacarídeo) quando comparado com outras BAL, o resultado da metabolização destes açúcares é o aumento da concentração de ácido lático, que diminui o pH e inibe o crescimento de outros micro-organismos aumentando a taxa de sobrevivência dos probióticos.

Estes dados nos mostram que a sacarose desempenha um importante papel na fermentação das bebidas vegetais. Os estudos comprovam que apesar do aumento nos sólidos solúveis, neste caso a sacarose ter pouco efeito sobre a viabilidade probiótica das bebidas elaboradas, ela no entanto auxilia na diminuição do pH, as bebidas sem adição de açúcares levaram maiores períodos de fermentação para chegar ao pH de corte do que bebidas adicionadas de açúcares, isso porque açúcares mais simples são rapidamente metabolizados. O pH considerado ideal para a preservação das bebidas e a manutenção de suas características sensoriais deve aproximar-se de 4,5. Um pH superior a 5 pode descaracterizar o produto, enquanto um pH muito ácido (< 4,0) prejudica a viabilidade das BAL. A acidez e o pH são parâmetros importantes a serem observados pois estão diretamente relacionados à conservação e a viabilidade probiótica da bebida fermentada.

Os resultados das análises do presente estudo revelam uma ampla variação na acidez das bebidas fermentadas, influenciada principalmente pelas diferentes temperaturas empregadas no processo fermentativo. Dentre as formulações, destaca-se a amostra 8, que apresentou a maior concentração de acidez (0,22 g AL/100mL). Esta amostra foi elaborada com 10% de açúcar e fermentada a 37 °C, condição ideal para o metabolismo do probiótico. É interessante notar que essa formulação, além de ter contribuído para uma elevada acidez, também se destaca por se aproximar do valor ideal de pH 4,5, considerado ótimo para a preservação das bebidas e a manutenção de suas características sensoriais. A correlação entre a concentração de açúcar, a temperatura e a acidez sugere que a escolha da formulação pode ser um elemento crucial na obtenção de bebidas fermentadas com características desejadas, equilibrando acidez e pH de maneira apropriada. Essa formulação específica pode ser considerada uma opção promissora para alcançar o perfil sensorial desejado para a bebida probiótica *plant-based*.

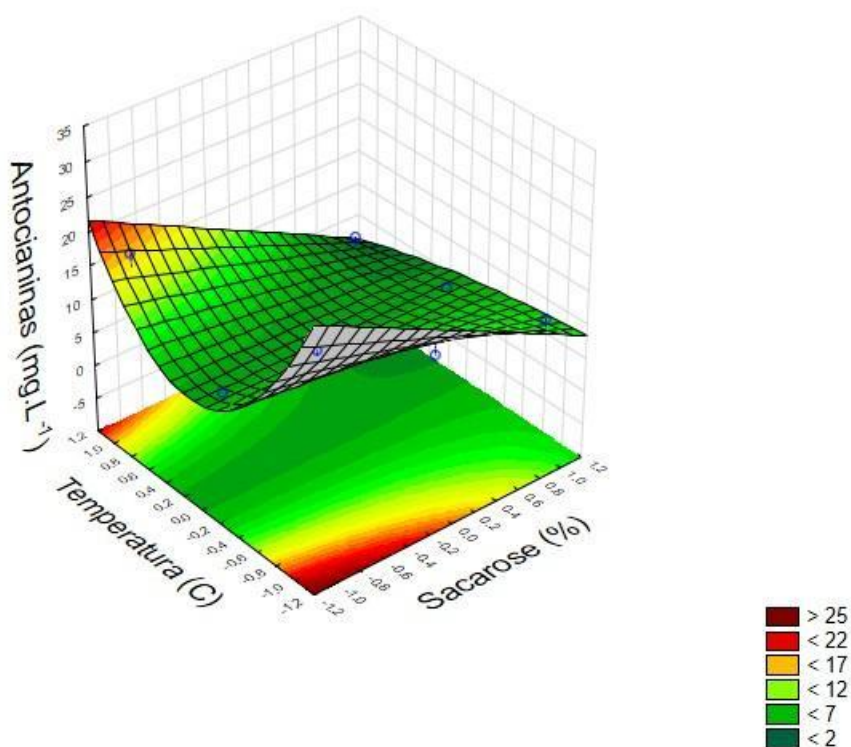
5.3 Antocianinas

O modelo utilizado para estimar o teor de antocianinas (y_3) presentes na bebida *plant-based* pode ser descrito pela equação $y_3 = 10,10 - 3,91.x_1 - 2,96.x_2 - 3,17.x_2^2 + 2,94.x_1.x_2^2$. A função-resposta (y_3) apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,91, evidenciando que o modelo se ajustou de forma adequada aos dados experimentais, sendo todos os termos da equação considerados significativos, evidenciando uma interação entre a sacarose e a temperatura de fermentação.

A Figura 9, utilizada para estimar o teor de antocianinas, indica que as concentrações mais elevadas destes compostos estão associadas a condições específicas de formulação. Na análise das variáveis significativas do modelo matemático destaca-se uma interação entre sacarose e temperatura, indicando uma influência conjunta dessas duas variáveis nos resultados observados. Em termos simples, a influência da sacarose na concentração de antocianinas pode depender da temperatura de fermentação empregada e vice-versa. Os valores de antocianinas variaram de 4,67 a 21,74 mg de antocianinas /L, sendo o menor valor obtido para a bebida que representa o ponto central do experimento (X_1 : 6%, X_2 : 37°C). Neste ensaio também a bebida apresentou pH próximo do ideal 4,8 e acidez de 0,17g AL/100mL. Considerando que o aumento na acidez e uma diminuição do pH são caracterizados pelo desenvolvimento das BAL, é possível que concentrações menores de antocianinas estejam relacionadas a um maior

desenvolvimento dos probióticos, esses resultados destacam a complexidade das interações entre os micro-organismos e os compostos bioativos.

Figura 9 - Superfície de resposta gerada para o teor de antocianinas, em função do percentual de sacarose (x_1) e da temperatura de fermentação (x_2) da bebida probiótica *plant-based*, $x_1 = -1$ (2%), 0 (6%) e +1 (10%); $x_2 = -1$ (27 °C), 0 (37 °C) e +1 (47 °C).



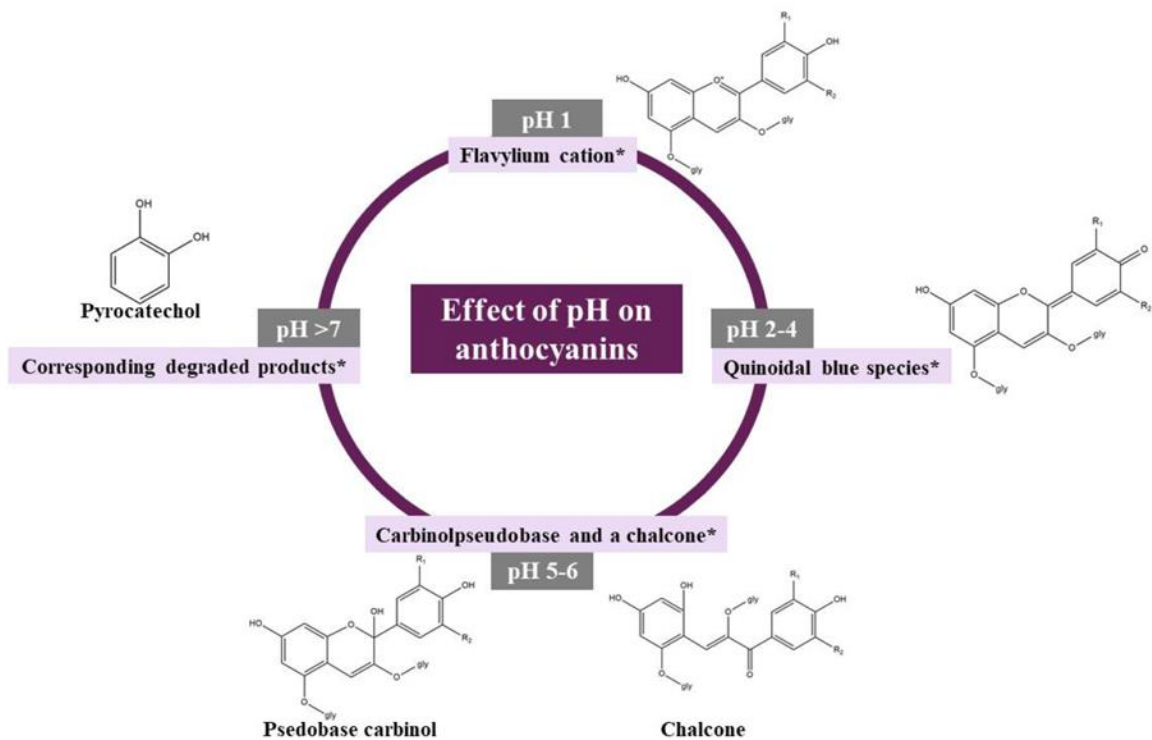
Fonte: Autoria própria (2023).

O índice de acidez e o pH são parâmetros muito importantes que influenciam também na determinação das antocianinas. As antocianinas são pigmentos que variam numa faixa de cores que vão do vermelho vivo ao violeta/azul, essa diferença de cores ocorre devido a sensibilidade e instabilidade que ela apresenta aos diferentes pH. Em soluções ácidas, as antocianinas apresentam cor vermelha, porém, à medida que o pH aumenta, a intensidade da cor diminui, enquanto em soluções alcalinas, ocorre a obtenção da cor azul, que são pigmentos bastante instáveis (Lopes *et al.*, 2007). Assim, o pH é um dos fatores que influencia a estabilidade das antocianinas, consequentemente sua biodisponibilidade e capacidade antioxidante.

Essas alterações se dão pelas quatro diferentes complexos que as antocianinas apresentam nos diferentes pH das soluções. Nos ambientes mais ácidos (pH 1,0), as antocianinas se encontram na forma cátion flavilium, responsável por cores características que

variam de vermelha ao roxo intenso. No pH de 2,0 a 4,0 as antocianinas se encontram na forma azul quinoidal, e entre 5,0 e 6,0 surgem as pseudobase de carbinol e uma chalcona, complexos incolores. Em pH acima de 7,0 as antocianinas são geralmente degradadas. As quatro formas existentes de antocianinas podem ser encontradas na faixa de 4,0 e 6,0 sendo o cátion flavilium o equilíbrio das formas (Enaru *et al.*, 2021).

Figura 10 - Efeito do pH nas antocianinas



Fonte: Zia Ul Haq (2006).

A fermentação é um bioprocessamento com capacidade de aumentar a disponibilidade de compostos bioativos, aumentando o valor nutricional dos alimentos, porém estudos mostram que existem alguns fatores que podem estar relacionados a capacidade de formação de novos compostos bioativos. Hur *et al.* (2014) afirmam que a capacidade do processo fermentativo melhorar e aumentar a concentração de compostos antioxidantes se deve a formação de compostos fenólicos e flavonóides que são resultado de reações metabólicas dos microorganismos que hidrolisam a estrutura celular das plantas que levam a liberação ou síntese de novos compostos antioxidantes.

Hur *et al.* (2014) listam alguns dos fatores que influenciam e mecanismos que aumentam a atividade antioxidante em alimentos *plant-based* fermentados, sendo as condições de

fermentação, a cepa probiótica utilizada, o efeito do pH de fermentação, a temperatura e a matriz utilizada os principais fatores relacionados as biotransformações.

O estudo elaborado por Braga *et al.* (2018) afirma que algumas bactérias possuem um sistema enzimático que é capaz de metabolizar as antocianinas presentes no substrato, bem como desempenhar um importante papel produzindo estes compostos, aumentando sua biodisponibilidade. O estudo testou bactérias das espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* quanto a capacidade de converter as antocianinas, a cepa *Lactobacillus deubruckii* alterou extensivamente as antocianinas presentes na polpa de juçara após o processo fermentativo, o meio foi elaborado com 10% se sacarose e 20% de polpa, os valores para cianidina 3-glicosídeo variaram de 0 a 3.217,7 µg/100 mL enquanto cianidina 3-rutinosídeo variou de 4.323,3 a 17.190,9 µg/100 mL após o processo fermentativo. O autor identificou como principal produto da bioconversão o ácido protocatecuico e também confirmou o aumento da atividade antioxidante da polpa de juçara após a fermentação.

Kwan *et al.* (2018) avaliou o efeito de três diferentes cepas probióticas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*) e os efeitos no perfil fenólico e atividade antioxidante do suco de amora fermentado a 37°C por 36 horas, para este estudo a bebida fermentada com o micro-organismo *L. plantarum* foi a que obteve maior atividade antioxidante.

Wang *et al.* (2023) também avaliou o efeito de três diferentes cepas na atividade antioxidante e no perfil fenólico de uma bebida a base de mirtilo fermentada a 37°C por 48 horas com *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. O autor constatou que houve um aumento significativo no teor de compostos fenólicos e flavonóides da bebida fermentada, porém as antocianinas (cianidinas) presentes em maior quantidade reduziram significativamente seus valores quando comparadas com a bebida controle, os valores reduzidos para cianidina-3-glicosídeo variaram de 1,14 µg/mL na bebida controle para 0,43 µg/mL e para cianidina-3-rutinosídeo variou 6,30 µg/mL a 2,99 µg/mL após a fermentação, sendo o menor valor obtido quando fermentado com *L. rhamnosus*.

Diante dos resultados obtidos e estudos analisados, torna-se evidente a complexidade das interações entre os micro-organismos e os compostos bioativos durante o processo fermentativo. A redução observada das antocianinas indica que além de estarem sendo metabolizados pelos probióticos, podem também participarem de reações químicas que contribuem para sua transformação e degradação, sendo os metabólitos resultantes diferentes da forma original destes compostos, além de que sua estabilidade pode ser afetada tanto pelo

pH como pelas condições do processo fermentativo. Estudos mais aprofundados são necessários para compreender completamente a complexidade das interações e dos mecanismos envolvidos entre os probióticos e os compostos bioativos, uma vez que é evidente que tais interações impactam significativamente a composição final da bebida probiótica *plant-based*.

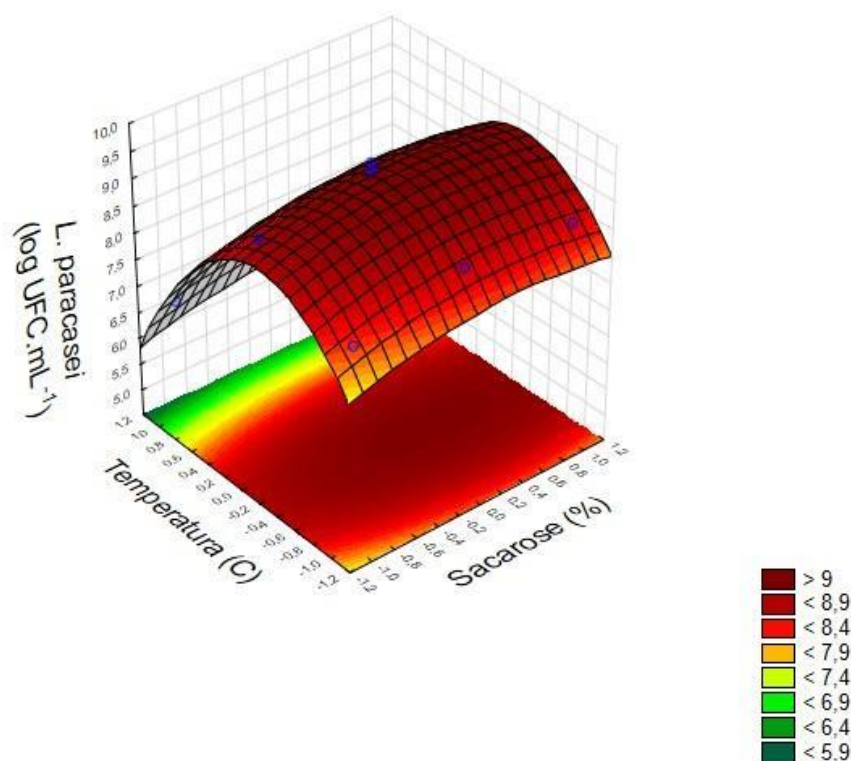
5.4 Contagem de *L. paracasei*

A partir da contagem de *L. paracasei* BGP1, foi observado um efeito significativo do teor de sacarose e da temperatura na função resposta investigada. Diante da análise de regressão e variância (ANOVA) para a contagem de *L. paracasei* (Tabela 6), analisou-se que os todos os termos utilizados na equação foram significativos tanto para X_1 (sacarose) quanto X_2 (temperatura). O modelo utilizado para estimar a viabilidade probiótica da bebida *plant-based* pode ser descrito como $Y_3 = 8,22 + 0,16.x_1 + 0,11.x_1^2 - 0,75.x_2 + 0,73.x_2^2$. A função-resposta Y_2 , que representa a contagem de BAL, apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,99, evidenciando que o modelo se ajustou de forma adequada aos dados experimentais (Tabela 6).

A análise do gráfico de superfície de resposta (Figura 11) destaca que a bebida probiótica *plant-based* fermentada atinge uma maior viabilidade probiótica, com uma contagem superior a 9 log UFC/mL, quando fermentada próxima do ponto central tanto para a variável sacarose (x_1 : 0; X_1 : 6%) como para a temperatura de fermentação (x_2 : 0; X_2 : 37°C). Nessas condições, a bebida revela uma contagem mais elevada do probiótico na fermentação, o que é altamente desejável.

O probiótico *L. paracasei*, é um micro-organismo de características mesofílicas, que exibe uma atividade metabólica mais intensa em temperaturas próximas a 37°C, considerada ótimas para o seu desenvolvimento. A presença de teores mais elevados de sacarose na bebida influencia de forma positiva, pois proporciona uma maior biodisponibilidade de substrato para serem utilizados nas reações metabólicas que ocorrem durante o processo fermentativo e desenvolvimento do probiótico. Os valores práticos obtidos para esse parâmetro variam entre 6,7 e 9,5 log UFC/mL, destacando que todas os ensaios apresentaram viabilidade probiótica (> 6 log UFC/mL), no entanto, destaca-se que os ensaios 5, 10 e 11 foram os que mais apresentaram viabilidade, sendo essa formulação em específica considerada uma opção promissora para alcançar o perfil probiótico desejado para a bebida *plant-based*.

Figura 11 - Superfície de resposta gerada para a contagem de *L. paracasei*, em função do percentual de sacarose (x_1) e da temperatura de fermentação (x_2) da bebida probiótica *plant-based*, $x_1 = -1$ (2%), 0 (6%) e +1 (10%); $x_2 = -1$ (27 °C), 0 (37 °C) e +1 (47 °C).



Fonte: Autoria própria (2023).

Balthar (2022) elaborou uma bebida com suco de uva 50%, adicionada de 3% de farinha de casca de uva e 7,5% de sacarose, fermentada por 18 horas a 37°C com *Lacticaseibacillus rhamnosus* LR 04, a bebida apresentou viabilidade probiótica de 6,9 log UFC/mL logo após a fermentação, sendo realizado também a contagem durante o período de armazenamento da bebida (4°C) que se manteve estável durante 30 dias com contagem > 8 log UFC/mL.

Jesus (2022) elaborou o desenvolvimento de uma bebida vegetal simbiótica à base de soja, acrescida de 3% de sacarose e 3% de inulina, fermentada por 6 horas a 37°C com *Lactobacillus paracasei* BGP 1, após a fermentação sua viabilidade foi acima de 7 log UFC/mL. O tempo de fermentação foi definido pelos testes prévios com interrupção ao atingir pH de 4,6 e o acompanhamento da viabilidade foi realizado antes, após a fermentação e durante seu armazenamento (4°C). Para acompanhar a viabilidade das bactérias probióticas utilizaram o método de contagem em placas pela técnica de semeadura em profundidade.

De acordo com Pereira *et al.* (2009) foram elaboradas bebidas a partir do extrato hidrossolúvel de soja, adicionadas de 2% de sacarose e três diferentes sabores (limão, abacaxi e ameixa), as bebidas foram fermentadas (42°C até atingir pH de 4,25) com cultura mista

liofilizada ativada de *L. casei*, *Streptococcus thermophilus* e *L. bulgaricus*. O pH foi atingido com 5 horas de fermentação, os autores explicam que existe uma relação simbiótica entre o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus*, que o crescimento simultâneo dessas duas culturas conduz a um tempo reduzido de coagulação do extrato, uma produção acentuada de ácido láctico e um desenvolvimento mais pronunciado de sabor e aroma característicos do produto final. A bebida após a fermentação apresentou contagem probiótica acima de $> 8 \log$ UFC/mL.

Com base na pesquisa conduzida por Santos (2020), foram desenvolvidas bebidas com *L. paracasei* LBC 81 fermentadas a 37°C por 9 horas, a formulação contendo 90% de grão-de-bico e 10% de coco, variando apenas os teores de açúcares (0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%). O probiótico apresentou contagem média final de $8,17 \log$ UFC/mL após o processo fermentativo sem diferença significativa entre as formulações, isso demonstra que os teores de açúcar adicionados nas formulações não influenciaram na viabilidade do *L. paracasei* LBC 81 durante o período de fermentação e de estocagem a 4 °C pelo período de 10 dias, porém independente da formulação houve uma tendência no aumento da contagem de probióticos em função do tempo de armazenamento. Isso sugere que a bebida de grão-de-bico e coco, mesmo a formulação sem adição de açúcares, pode ser considerada uma excelente matriz para o crescimento e sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81. As bebidas fermentadas a partir de matrizes vegetais podem ser uma alternativa viável a leites fermentados, devido aos seus benefícios nutricionais e viabilidade probiótica atestada.

Com base nos estudos apresentados, é possível observar que a viabilidade probiótica nas bebidas fermentadas está relacionada a diversos fatores, incluindo os teores de sacarose e a composição da matriz, pois no presente estudo a sacarose mostrou-se significativa no desenvolvimento do probiótico o que pode estar relacionada a combinação das diferentes matrizes vegetais da bebida, a presença dominante de extrato de hibisco (60%) e menor concentração de extrato hidrossolúvel de soja (30%) na formulação podem ser cruciais para esse efeito. As características distintas desses extratos, quando combinadas, influenciam as condições que favorecem a viabilidade dos probióticos, destacando a importância de entender essa interação para avaliar o impacto desses fatores nas bebidas fermentadas *plant-based*.

6 CONCLUSÃO

A bebida *plant-based* formulada com extrato de hibisco e soja demonstrou ser um substrato adequado para o crescimento do probiótico *L. paracasei* BGP 1 nas diferentes condições de fermentação e teor de sacarose testadas. A maior viabilidade celular obtida (> 9 log UFC/ mL) quando a bebida foi formulada com 6% de sacarose e incubada a 37°C por 12 horas. A formulação que utilizou 10% de sacarose e foi fermentada a 37°C resultou no menor valor de pH, atingindo uma acidez de 0,22%. Na determinação do teor de antocianinas monoméricas, notavelmente, quando a bebida probiótica apresentou melhor desenvolvimento e contagem de *L. paracasei* BGP 1 também houve maior redução destes compostos bioativos, que podem estar sendo metabolizados e consumidos pelos micro-organismos como substrato durante o seu processo de desenvolvimento. Conforme a avaliação da desejabilidade para cada parâmetro (pH, acidez e contagem de *L. paracasei*), a condição ideal de fermentação, que otimiza os resultados experimentais, é quando a bebida é preparada com 6% de sacarose e fermentada à temperatura de 37°C.

REFERÊNCIAS

- ABREU, B. B. *et al.* Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante em cálice de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2019.
- ABREU, C. R. A. *et al.* Avaliação química e físico-química de bebidas de soja com frutas tropicais. **Alim. Nutr**, Araraquara. v.18, n.3, p. 291-296, 2007.
- AGUIAR, J. D. R.; SANTOS, V. O. **Plant based**: correlação com dietas vegetarianas e sua importância na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos) – Faculdade de Tecnologia de Marília, São Paulo, 2022.
- ALEIXO, M. G. B. *et al.* Controle e redução de doenças crônicas não transmissíveis através da dieta à base de plantas: uma revisão abrangente. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 6, p. 65-81, 2021.
- ALI, B. H.; WABEL, N. A.; BLUNDEN, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 5, p. 369-375, 2005.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em Alimentos–Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANVISA. Gerência-Geral de Alimentos (GGALI). **Alteração taxonômica de espécies do gênero *Lactobacillus***: perguntas e respostas. Brasília, 1ª Ed. 2021.
- BADARÓ, A. C. L. *et al.* Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana–parte 1. **Nutrir Gerais**, v. 2, n. 3, p. 1-29, 2008.
- BALTHAR, R. O. **Estudo do potencial bioativo e tecnológico de bebidas de base vegetal e do yacon**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Alimento e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.
- BAÚ, T. R. *et al.* Probiotic Plant-Based Beverages. In: Adriano Gomes da Cruz *et al.* (eds.), **Probiotic Foods and Beverages: Technologies and Protocols, Methods and Protocols in Food Science**. New York: Springer Nature, 2023.
- BENASSI ; V. T., MANDARINO; J. M. G., 2003. **Extrato de soja e produtos derivados**. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/466679/1/ID23611.pdf>. Acesso em: abril/2023.
- BLOCK, J. M. *et al.* **Uma abordagem bibliográfica sobre bebidas vegetais**: seu potencial econômico, consumo, características de composição e processo produtivo. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

BOAS, M. P. P. V. *et al.* Bebidas vegetais elaboradas com oleaginosas brasileiras: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 2, p. 1-21, 2023.

BRAGA, A. R. C. *et al.* A fermentação de *Lactobacillus* da polpa de juçara leva à conversão enzimática de antocianinas aumentando a atividade antioxidante. **Jornal de Composição e Análise de Alimentos**, v. 69, p. 162-170, 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p. 4.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

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, 2010.

CAMILLO, J. Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.). **A planta da vez**. 2015. Disponível em: <https://www.aplantadavez.com.br/2015/05/vinagreira-hibiscus-sabdariffa-1.html> Acesso em: junho/2023.

CARRÃO-PANIZZI *et al.* Variação ambiental e genética do teor de isoflavonas em sementes de soja cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1444-1451, 2009.

CASTAÑEDA, L. M. F. . **Antocianinas**: o que são? onde estão? como atuam. Apresentação de Seminário (Doutoranda em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CHOU, C. C.; HOU, J. W. Crescimento de bifidobactérias em leite de soja e sua sobrevivência na bebida fermentada de leite de soja durante o armazenamento. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 2-3, p. 113-121, 2000.

CIRILO, G. M. D.; OLIVIERI, C. M. R.; MARTINS, M. C. T. Bebidas vegetais alternativas ao leite: comparação nutricional com leite de vaca. **Life Style**, v. 7, n. 1, p. 15-25, 2020.

COSTA, M. *et al.* Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, 2013.

CUI, Y.; QU, X. Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 486-499, 2021.

DA SILVA CARNEIRO, C. *et al.* Leites fermentados: histórico, composição, características físico-químicas, tecnologia de processamento e defeitos. **PUBVET**, v. 6, p. 1423-1428, 2012.

DA SILVA, K. A. L. *et al.* Bebida fermentada de extrato hidrossolúvel de soja (*Glycine max* L) sabor ameixa. **Conjecturas**, v. 23, n. 1, p. 326-347, 2023.

DE SOUZA, C. M. D. *et al.* Probióticos e a indústria de alimentos: Uma visão geral. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 3, p. 79-101, 2020.

DEZIDERIO, M. A. **Desenvolvimento de bebida fermentada funcional de origem vegetal**. 2019. Tese de Mestrado (Mestre em Ciências PPG Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo.

DOS SANTOS, J.; SOMERA, T. **Efeito das condições de infusão sobre o teor de compostos bioativos do chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos) – Instituto Federal de Santa Catarina, São Miguel do Oeste, 2022.

DOS SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista científica do ITPAC**, v. 4, n. 1, p. 40-49, 2011.

DOS SANTOS, U. *et al.* Avaliação de potencial de ervas medicinais: Capim-limão (*Cymbopogon citratus* DC), Chá verde (*Camellia Sinensis* L.) E. hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) para obtenção de chás solúveis. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 4, p. 1399-1408, 2014.

EMBRAPA. **Alimentos plant-based são tema de seminário on-line**.2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/68936939/alimentos-plant-based-sao-tema-de-seminario-on-line>. Acesso em: maio/2023.

EMBRAPA. **Soja em números**.2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: abril/ 2023.

EMBRAPA. **Soja**. 2023. Disponível em : <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20o%20segundo,113%2C92%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas>. Acesso em: 07/04/ 2023.

ENARU, B. *et al.* Antocianinas: Fatores que afetam sua estabilidade e degradação. **Antioxidantes** , v. 10, n. 12, p. 1967, 2021.

FEREIRA; T. H. B., FARIA; I. N., MUNHOZ; C. L. Elaboração de bebidas fermentadas de soja por probióticos e acrescidas de prebióticos. **Revista Inova Ciência & Tecnologia**. Uberaba, p. 18-23, v. 5, n. 2, 2019.

GONÇALVES, E. M. *et al.* Tendências e oportunidades na fermentação de produtos vegetais. **Vida rural**. p. 72-77, 2021.

HASHEMI, S. M. B. *et al.* Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. **J Funct Foods**, v. 38, p. 409 – 414, 2017.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, 2014.

- HOFVENDAHL, K.; HÄGERDAL-HAHN, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.
- HUR, S. J. *et al.* Efeito da fermentação na atividade antioxidante em alimentos vegetais. **Química Alimentar**, v. 160, p. 346-356, 2014.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. Ed. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008.
- IRIGOYEN, A. *et al.* Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, n.4, p. 613-620, 2005.
- JABEUR, I. *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L. como fonte de nutrientes, compostos bioativos e corantes. **Food Research International**, v. 100, p. 717-723, 2017.
- JESUS, L. O. P. **Desenvolvimento de bebida vegetal simbiótica à base de soja**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2022.
- KWAN, E. *et al.* Effect of *Lactobacillus* Strains on Phenolic Profile, Color Attributes and Antioxidant Activities of Lactic-Acid-Fermented Mulberry Juice. **Food Chemistry**, vol. 250, p. 148–154, 2018.
- LEAL, V. J. G. **Efeito de açúcares em bebida de soja fermentada por bactérias probióticas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2017.
- LEANDRO, A. D. *et al.* **Desenvolvimento de pellets probióticos em matriz vegetal e adição em matriz de frutas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2021.
- LEE, J., DURST, R. W., e WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, 88, p.1269-1278, 2005.
- LIU, R. H. Fitoquímicos de grãos integrais e saúde. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 207-219, 2007.
- LOPES, A. R. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- LOPES, T. *et al.* Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 3, 2007.
- LUZ, G. M.; PALLONE, J. A. L. Alimentos à base de plantas: dietas, tendências de mercado, composição nutricional e ensaios in vitro de bioacessibilidade e biodisponibilidade de minerais. São Paulo: **Científica Digital**, 2022.

MACHADO, L. F.; RIZZATTO, M. L. Produção e análises físico-químicas de bebida probiótica de suco de maracujá. **Revista Cogitare**, v. 2, n. 1, p. 50-69, 2019.

MACIEL NETO, P. **Investigação dos critérios de escolha para alimentos *plant-based***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MANDARINO; J. M. G., PANIZZI; M. C. C., 2021. **Soja na alimentação**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pos-producao/soja-na-alimentacao>. Acesso em: abril/2023.

MANDARINO; J. M. G., s/d . **Componentes do grão de soja e seus efeitos na fisiologia humana** . Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355202/1529289/Componentes+do+gr%C3%A3o+de+soja+e+seus+efeitos+na+fisiologia+humana.pdf/e53a219a-f981-1751-3f70-88176f4e2be2#:~:text=Os%20carboidratos%20insol%C3%BAveis%20presentes%20no,se%20nas%20chamadas%20fibras%20insol%C3%BAveis> Acesso em: abril/2023.

MARIN, M. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de bebida probiótica de soja. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 32, n. 1, 2014.

MCMACKEN, M.; SHAH, S. Uma dieta baseada em vegetais para a prevenção e tratamento do diabetes tipo 2. **Jornal de cardiologia geriátrica: JGC**, v. 14, n. 5, p. 342, 2017.

MINELLI, E. B.; BENINI, A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 20, n. 4, p. 180-183, 2008.

MORAIS; Á. A. C. D. **Usos da soja em medicina**. Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana. Embrapa, Londrina-PR, 2001.

NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B. ;NEUMAIER, N., (2021) **Características da soja** . Disponível em : [https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/caracteristicas-da-especie-e-relacoes-com-o-ambiente/caracteristicas-da-soja#:~:text=Desenvolvem%20vagens%20\(legumes\)%20levemente%20arqueadas,marrom%20C%20ou%20amarelo%20Dpalha](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/caracteristicas-da-especie-e-relacoes-com-o-ambiente/caracteristicas-da-soja#:~:text=Desenvolvem%20vagens%20(legumes)%20levemente%20arqueadas,marrom%20C%20ou%20amarelo%20Dpalha). Acesso em: abril/2023

NETO, P. *et al.* Alimentos à base de plantas: estudo dos critérios de escolha do consumidor. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 7, p. 1-19, 2020.

NGUYEN, Q. V.; CHUYEN, H. V. Processing of herbal tea from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Effects of drying temperature and brewing conditions on total soluble solid, phenolic content, antioxidant capacity and sensory quality. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 2, 2020.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. da C. R. Probióticos-Revisão da Literatura. **Rev. bras. ciênc. saúde**, p. 487-492, 2011.

OLIVEIRA, M. N. D. *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2002.

PEREIRA, A. L. F. **Elaboração e secagem em spray dryer de bebida probiótica formulada a partir da fermentação do suco de caju**. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

PEREIRA, C. A. S.; OLIVEIRA, F. B. **Soja alimento e saúde, Valor nutricional e preparo**. Viçosa: UFV, 1 ° Ed., 2004, reimpressão 2006.

PEREIRA, M. O. *et al.* Elaboração de uma bebida probiótica fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja com sabor de frutas. **Ambiência**, v. 5, n. 3, p. 475-487, 2009.

PIOVESANA, A. **Extração, identificação, quantificação e microencapsulamento por atomização e liofilização de compostos bioativos dos cálices de hibisco (*hibiscus sabdariffa* L.)**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

RAMOS, A. L. C. C. *et al.* **Bebida fermentada com potencial probiótico à base de extrato hidrossolúvel de soja com adição de grumixama (*Eugenia brasilienses*)**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

REIN, M. *et al.* **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**. Academic Dissertation (Food Chemistry) - University of Helsinki, Finland, 2005.

REIS, A. P.; SIQUEIRA, K. B. O mercado de produtos imitadores de lácteos no Brasil. **Revista: Indústria de Laticínios**, p. 95-100, 2021.

RIBEIRO, A. Â. M. *et al.* ***Hibiscus sabdariffa* L.: estabilidade da atividade antioxidante e constituintes químicos após preparo do chá**. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 2, p. 102-109, 2018.

RIBEIRO, E. S. S. **Elaboração e caracterização de bebida probiótica a partir de suco de cajá fermentado com *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

ROCHA, N. D. C. **Prospecção de bactérias lácticas para uso como probióticos e avaliação do efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G. D.; FARIA, J. D. A. F. Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas. In: **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 2011. 669 p.

SAARELA, M. *et al.* Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1477-1482, 2006.

SALGADO, J. Alimentos funcionais. Edição 1, São Paulo: **oficina de textos**, 2017. 256 p.

SANGALETI, G. S. S. G. M. G. **Desenvolvimento e caracterização de sorvete *plant based* formulado com bebida vegetal de cará (*Dioscorea alata* L.) e substituição parcial de açúcar pelo eritritol**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2022.

SANTOS, M. C. M. **Bebida de grão-de-bico e coco fermentada por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 elaborada com diferentes teores de açúcar**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Nutrição Humana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

SANTOS, R. B. *et al.* Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2011.

SATIJA, A.; HU, F. B. Dietas à base de plantas e saúde cardiovascular. **Tendências em medicina cardiovascular**, v. 28, n. 7, p. 437-441, 2018.

SILVA, N. C. S. *et al.* Estudo de estabilidade de um creme dermatológico vegetal rejuvenescedor facial desenvolvido com extrato de *hibiscus sabdariffa*. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 2, n. 1, 2019.

SIMPÓSIO DE ALIMENTOS. VI, 2009, Passo Fundo. **Viabilidade de elaboração de bebida fermentada probiótica à base de soja**. Universidade de Passo Fundo. p. 126-131.

SOBOTA, J. D. F. *et al.* Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. **Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 33-46, 2016.

SOUZA, R. S. D. **Elaboração de bebida probiótica sabor manga e uva com *Lactobacillus acidophilus***. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

STATSOFT. Statistica Academic Ultimate (Software de Análise de Dados). Versão 2021. Disponível em: <https://statsoft-academic.com.br/collections/frontpage>

SWAIN, M. R. *et al.* Frutas e vegetais fermentados da Ásia: uma fonte potencial de probióticos. **Biotechnology research international**, v. 2014, 2014.

VENTURINI FILHO, W. G. (coord.). Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia. São Paulo: **Blucher**, p. 385, 2010.

VILLAMIL, R. A. *et al.* Desenvolvimento de produtos lácteos funcionais e suas implicações para a saúde: Uma revisão de literatura. **Revista chilena de nutrição**, v. 47, nº. 6, p. 1018-1028, 2020.

VIZZOTTO, M.; CASTILHO, P. M.; PEREIRA, M. C. Compostos bioativos e atividade antioxidante em cálices de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 2009. 7 p.

WANG, J. *et al.* Avaliação da biotransformação fenólica e das propriedades promotoras da saúde do suco de mirtilo após fermentação por bactérias lácticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** , v. 43, 2023.

WENDLING, L. K.; WESCHENFER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E.E; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **Lebensm. Wiss. U. Technol.** V. 38, p. 73-75, 2005.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E.E; HANG, Y. D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology.** V. 97, p. 1427-1430, 2006.

ZHENG, J. *et al.* Uma nota taxonômica sobre o gênero *Lactobacillus*: Descrição de 23 novos gêneros, descrição corrigida do gênero *Lactobacillus Beijerinck* 1901 e união de *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. **Jornal internacional de microbiologia sistemática e evolutiva** , v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

ZHONG, H. *et al.* Probiotics-fermented blueberry juices as potencial antiabetic product: antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potentials. **Jounal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 10, p. 4420-4427, 2021.

ZIA UL HAQ, M. *et al.* Biosynthesis and stability of anthocyanins. **Anthocyanins and human health: biomolecular and therapeutic aspects**, p. 71-86, 2016.