

**VITAMINA B12 E ISOFLAVONAS NO  
EXTRATO DE SOJA ADICIONADO DE  
PREBIÓTICOS E  
FERMENTADO COM PROBIÓTICOS**

**MARGARITA ROSA CABRAL**

**2009**

**MARGARITA ROSA CABRAL**

**VITAMINA B12 E ISOFLAVONAS NO EXTRATO DE SOJA  
ADICIONADO DE PREBIÓTICOS E  
FERMENTADO COM PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

**Orientadora:**  
**Profa. Dra. Maria de Fátima Pícolo Barcelos**

**LAVRAS**  
**Minas Gerais – Brasil**  
**2009**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Cabral, Margarita Rosa.

Vitamina B<sub>12</sub> e isoflavonas no extrato de soja adicionado de prebióticos e fermentado com probióticos / Margarita Rosa Cabral. – Lavras : UFLA, 2009.

128 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Maria de Fátima Piccolo Barcelos.

Bibliografia.

1. Alimento funcional. 2. Iogurte de extrato de soja. 3. Vitamina B12. 4. Isoflavonas. 5. Probióticos. 6. Prebióticos. 7. Oligofrutose. 8. Inulina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.805655

– 663.64

MARGARITA ROSA CABRAL

**VITAMINA B12 E ISOFLAVONAS NO EXTRATO DE SOJA  
ADICIONADO DE PREBIÓTICOS E  
FERMENTADO COM PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em

Prof. Dr. Aduino Ferreira Barcelos                      EPAMIG

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu                              UFLA

Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas              UFLA

Profa. Dra. Maria de Fátima Pícolo Barcelos  
UFLA  
(Orientadora)

**LAVRAS**  
**Minas Gerais - Brasil**

À Deus, porque nele existimos.  
Às Aldeias para Crianças S.O.S. Paraguai e do mundo todo, para aplicar.  
À Silvia Maria e Larisa Beatriz, almas companheiras.  
À Lila, querida irmã, pela fé que teve em mim.  
Aos professores, pela guia e orientação.

## **OFEREÇO**

À Juan Ramón e Lilia Irene,  
amados pais,  
*In memoriam*

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras através do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de superação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Pícolo Barcelos, pela paciência, dedicação e amizade.

Aos professores Luiz Ronaldo de Abreu, Eric Batista Ferreira e Adelir Aparecida Saezk, pela ajuda e disponibilidade.

Às laboratoristas Constantina Braga Torres, Creusa Resende e Maria Aparecida Correa Lima, pelo apoio técnico.

À Débora Kono, pela valiosa colaboração e, à Sueli Ciabotti, pela solidariedade.

À EMBRAPA-Soja, na pessoa do Sr. José Marcos Gontijo Mandarino, pela doação dos grãos de soja e pela realização das análises de isoflavonas.

À EMBRAFARMA-Brasil, na pessoa do Sr. Valdir Magalhães, pela doação dos prebióticos.

Ao Laboratório HIDROCEPE, nas pessoas do Dr. George Barquete e esposa, Cinthia Daniela R. da S. Costa, Rita de Cássia Silva, Tatiane Souza Xavier, pela realização das análises de vitamina B<sub>12</sub>.

Ao Dr. José Maria Campos, pelo exemplo, inspiração e incentivo.

A todos os que de uma ou outra maneira contribuíram à manifestação deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÒRICO .....	4
2.1 Alimentos funcionais: histórico e legislação .....	4
2.2 Soja na alimentação humana e ação como alimento funcional .....	6
2.2.1 Frações bioativas ou funcionais da soja .....	13
2.2.2 Consumo de soja na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis .....	15
2.2.3 Antinutrientes da soja e respectivos mecanismos de ação.....	18
2.3 Bactérias utilizadas na fermentação do extrato de soja para a obtenção do “iogurte” de soja.....	20
2.3.1 Probióticos .....	20
2.3.1.1 Aspectos de segurança .....	22
2.3.1.2 Aspectos funcionais .....	22
2.3.1.3 Aspectos tecnológicos .....	23
2.3.1.4 Gênero <i>Bifidobacterium</i> . .....	24
2.3.1.5 Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	26
2.3.2 Gênero <i>Streptococcus</i> .....	27
2.3.3 Ecologia das <i>Bifidobacterias</i> e <i>Lactobacillus</i> .....	28
2.3.4 Valor terapêutico atribuído aos probióticos .....	29
2.3.4.1 Potencial valor terapêutico de alimentos funcionais contendo agentes probióticos e possíveis mecanismos de ação .....	31
2.4 Prebióticos .....	34
2.5 Vitamina B <sub>12</sub> .....	37

2.5.1 Vitaminas do complexo B.....	37
2.5.2 Histórico da vitamina B <sub>12</sub> .....	37
2.5.3 Caracterização da vitamina B <sub>12</sub> .....	38
2.5.4 Fisiologia da vitamina B <sub>12</sub> .....	38
2.5.5 Funções da vitamina B <sub>12</sub> .....	41
2.5.6 Ingestão Dietética de Referência da vitamina B <sub>12</sub> .....	42
2.5.7 Fontes de vitamina B <sub>12</sub> .....	44
2.5.8 Deficiência da vitamina B <sub>12</sub> .....	45
2.5.9 Estabilidade da vitamina B <sub>12</sub> .....	52
2.5.10 Bactérias que sintetizam vitamina B <sub>12</sub> .....	53
2.5.11 Novas áreas de estudos sobre as bactérias.....	54
2.5.12 Dosagem de vitamina B <sub>12</sub> em alimentos por CLAE .....	54
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	56
3.1 Considerações gerais .....	56
3.2 Extrato de soja e processo fermentativo para obtenção do “iogurte” de soja .....	58
3.3 Métodos de análises físico-químicas e químicas. ....	58
3.4 Análises estatísticas .....	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
4.1 Composição centesimal .....	64
4.2 pH e acidez titulável .....	65
4.3 Minerais determinados.....	67
4.4 Teores de isoflavonas e de vitamina B <sub>12</sub> no “iogurte” de soja fermentado por 6h (experimento 1) .....	69
4.5 Vitamina B <sub>12</sub> no “iogurte” de soja em diversos tempos de fermentação (experimento 2) .....	78
4.6 Comparação dos teores de vitamina B <sub>12</sub> em “iogurte” de soja e produtos lácteos analisados .....	81

5 CONCLUSÕES .....	83
POSSIBILIDADES E FUTURAS PESQUISAS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86
LISTA DE FIGURAS .....	102
LISTA DE TABELAS .....	103
ANEXOS.....	104

## RESUMO

CABRAL, Margarita Rosa. **Vitamina B<sub>12</sub> e isoflavonas no extrato de soja adicionado de prebióticos e fermentado com probióticos**. 2009. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)\* - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Novos produtos alimentícios que vão além da função de nutrir ou satisfazer o palato são conhecidos como alimentos funcionais, e visam reduzir o risco de doenças crônicas não transmissíveis. A soja e alimentos acrescentados com prebióticos e probióticos são classificados como alimentos funcionais. Os grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] utilizados foram do cultivar BRS-213, livre de lipoxigenase, cedidos pela EMBRAPA-Soja-Brasil. O objetivo deste trabalho foi quantificar os teores de vitamina B<sub>12</sub> e isoflavonas em diferentes formulações de “iogurte” de soja escolhendo a mais favorável para a produção da vitamina B<sub>12</sub>, e determinar novamente nesta, em diversos tempos de fermentação, teores de vitamina B<sub>12</sub>. O trabalho teve duas etapas: um primeiro experimento no qual foram comparados diversos substratos de fermentação para avaliar o efeito dos mesmos sobre o comportamento das isoflavonas e vitamina B<sub>12</sub>, e definir qual deles era o mais favorável para a produção desta vitamina. Os substratos utilizados foram: 1: extrato de soja fermentado com probióticos, 2, 3 e 4: extrato de soja fermentado com probióticos e adicionado com diversas quantidades de oligofrutose e inulina, 5: extrato de soja fermentado com probióticos e adicionado de glucose de milho. Um segundo experimento, no qual foi avaliado o comportamento da vitamina B<sub>12</sub> ao longo do tempo. As quantificações das variáveis de interesse foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os “iogurtes” de soja foram submetidos também as análises físico-químicas e químicas, e os resultados obtidos às análises estatísticas. Verificou-se que qualquer um dos substratos utilizados é favorável para a produção de vitamina B<sub>12</sub>, e que a presença desta é muito significativa no “iogurte” de soja (em média 85µg.100g<sup>-1</sup>). Também que o teor da vitamina aumenta ao longo do tempo de fermentação até o tempo limite estudado de 6 h. Para as isoflavonas verificou-se que o processo de fermentação produz diminuição das mesmas, pois o teor destas no extrato de soja foi muito superior aos teores dos “iogurtes. A adição de ingredientes produz diminuição de isoflavonas, os prebióticos de maneira mais acentuada que a glucose de milho. A adição de um teor elevado de prebióticos produz grande diminuição de isoflavonas em comparação a uma adição moderada destes, que não produzem grande diminuição durante a fermentação, mas, a diminuição pode dever-se a uma transformação dos componentes das isoflavonas em outros compostos.

\* Comitê Orientador: Maria de Fátima Piccòlo Barcelos – UFLA (orientadora), Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA e Eric Batista Ferreira – UNIFAL.

## ABSTRAC

CABRAL, Margarita Rosa. **Vitamin B<sub>12</sub> and isoflavonas in the added soy extract of prebiotic and fermented with probiotic**. 2009. 128p. Dissertation (Master's degree in Science of the Foods)\* - Federal University of Lavras, Lavras, MG.

New nutritious products that space besides the function of to nurture or to satisfy the palate is known as functional foods, and they seek to reduce the risk of chronic diseases no transmissible. The soy and foods increased with prebióticos and probióticos are classified as functional foods. The soy grains [Glycine max (L.) Merrill] used were of cultivating BRS-213, free from lipoxigenase, given in by the EMBRAPA-soy. The objective of this work was to verify the addition or not of ingredients (prebióticos or glucose) to the soy extract fermented with probióticos interferes in the isoflavonas tenors and of vitamin B<sub>12</sub> of the soy "yogurt", and if the amount of this vitamin suffers alterations with several times of fermentation. This work consists of two stages, a first experiment in which several fermentation substrata were compared to evaluate the effect of the same ones on the behavior of the isoflavonas and vitamin B<sub>12</sub>, and to define which belonged the most favorable for the production of this vitamin to them. Then, a second experiment, in which the behavior of the vitamin was evaluated B<sub>12</sub> along the time. The quantifications of the variables of interest were accomplished by Cromatografia Liquidates of High Efficiency (CLAE). The soy "yogurts" were also submitted the physiochemical and chemical analyses, and the results obtained ace statistical analyses. It was verified that any one of the used substrata is favorable for the vitamin production B<sub>12</sub>, and that the presence of this is very significant in the soy "yogurt" (in it measured 85µg/100g). Also that the tenor of the vitamin increases along the time of fermentation to the time limits studied. For the isoflavonas it was verified that the fermentation process produces decrease of the same ones, because the tenor of these in the soy extract was very superior to the tenors of the "yogurts", but, they are still in the "yogurt" significant amounts, the difference of other sub-products of the soy, where a loss happens almost it completes. The addition of ingredients produces isoflavonas decrease, the prebióticos in a more way accentuated that the corn glucose. The addition of a high tenor of prebióticos produces great isoflavonas decrease in comparison with a moderate addition of these, that don't produce great decrease during the fermentation, but, the decrease can be due to a transformation of the components of the isoflavonas in others composed.

\* Comitê Orientador: Maria de Fátima Piccòlo Barcelos – UFLA (orientadora), Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA e Eric Batista Ferreira – UNIFAL.

## 1 INTRODUÇÃO

Novas áreas da Ciência dos Alimentos podem conjugar-se, para o desenvolvimento de alimentos, que possam potencializar sua ação terapêutica para benefício do ser humano no sentido de diminuir riscos à saúde: a probiótica, a prebiótica, a simbiótica e o estudo dos alimentos funcionais.

Alimentos funcionais são aqueles que além de nutrir ajudam a evitar os riscos de doenças crônicas não transmissíveis (Sgarbieri & Pacheco, 1999; Park, 1999).

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é reconhecida como alimento funcional e o extrato de soja (“leite de soja”) constitui um substrato ideal para a fermentação de bactérias, em particular, para as do gênero *Bifidum*, (probióticos) porque, de forma natural, estão presentes na soja a sacarose e outros carboidratos de ação prebiótica como a rafinose e a estaquiose (Tamine et al., 1995). As vantagens advindas dos probióticos para a saúde do ser humano são amplas e comprovadas (Gibson & Williams, 1999).

As Bífidobactérias crescem melhor em meios que contêm fitona (peptona de soja) e a proteína da soja também protege às Bífidobactérias da ação dos sais biliares, favorecendo à colonização intestinal (Tamine et al., 1995 e Shimakawa et al., 2003). As ditas bactérias apresentam crescimento fraco no leite de vaca (Rasic, 1990), comparado ao extrato de soja, no qual proliferam com facilidade.

Podem-se adicionar ao extrato de soja prebióticos (substrato de probióticos), a exemplo da oligofrutose e inulina, que estimulam acentuadamente a multiplicação das colônias de probióticos, assegurando a viabilidade das mesmas, tanto durante a vida de prateleira do produto, como no intestino, após serem ingeridas (Haully et al., 2005; Fuchs et al., 2005 e Pak,

2006), para logo proceder a adição dos probióticos selecionados, neste caso, bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e outros, visando obter um produto com características funcionais específicas como um “iogurte” de soja com elevado teor de vitamina B<sub>12</sub>, entre outros nutrientes. A vitamina B<sub>12</sub> é produzida pelas bactérias probióticas selecionadas, como produto primário de seu metabolismo (Arunachalam, 1999; Marshall & Cole, 1983).

Alimentos que contêm probióticos e prebióticos estão classificados como funcionais e denominam-se simbióticos, esta combinação implica sinergismo, isto é: aumento do benefício (Schrezenmeir & De Vrese, 2001).

Temperatura e tempo ideal de fermentação, assim como pH e acidez, são parâmetros que devem preencher os requisitos de valores favoráveis para a sobrevivência e metabolismo das bactérias, portanto, para a produção da vitamina B<sub>12</sub> e, para a obtenção de um produto com boa aceitabilidade por parte do consumidor, a oligofrutose e inulina melhoram a textura e propriedades sensoriais do produto e o realçam com os benefícios que por sua vez aportam (Haully et al., 2005; Fuchs et al., 2005; Pak, 2006).

A vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) é uma vitamina hidrossolúvel do grupo de vitaminas do complexo B, produzida exclusivamente por bactérias e as fontes alimentícias usuais da mesma são de origem animal. A deficiência de vitamina B<sub>12</sub> implica graves riscos para a saúde, leva a estados de anemia megaloblástica, anemia perniciosa e alterações neurológicas, que podem ser progressivas e até fatais, se não houver tratamento. Os humanos são incapazes de sintetizar esta vitamina e, portanto, são dependentes da dieta para sua obtenção (Kelly, 1997, Andrés et al., 2004, Slywitch, 2006).

As isoflavonas, consideradas fitohormônios por possuírem estrutura química semelhante ao estrogênio, encontram-se presentes em alguns alimentos a exemplo da soja e seus produtos e, são estas, juntamente com a proteína, as que conferem à soja a denominação de alimento funcional, sendo as principais

responsáveis pelo relevante valor terapêutico atribuído a esta leguminosa. As isoflavonas presentes no iogurte de soja devem ser quantificadas, pois, conforme Jackson et al. (2002) e Murphy et al, (2002) o calor e alguns fatores como a fermentação, podem alterar, significativamente, a distribuição das isoflavonas em alimentos à base de soja.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são:

**Objetivo geral:**

Avaliar os teores de vitamina B<sub>12</sub> e isoflavonas em diferentes formulações de “iogurte” de soja obtidos da fermentação com probióticos em diversos tempos de fermentação.

**Objetivos específicos:**

- Quantificar o teor de vitamina B<sub>12</sub> e isoflavonas nos “iogurtes” de soja, adicionados ou não de prebióticos e fermentados por 6 horas.
- Avaliar os teores vitamina B<sub>12</sub> no extrato e “iogurte” de soja mais favorável à produção da vitamina B<sub>12</sub>, em diversos tempos de fermentação.
- Determinar a composição centesimal do grão de soja, extrato de soja (leite de soja), e “iogurte” de soja.
- Determinar o pH e acidez titulável do extrato e “iogurtes” de soja.
- Verificar a quantidade dos minerais no extrato e “iogurtes” de soja: Cálcio, Ferro, Sódio, Potássio, Magnésio e Zinco.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Alimentos funcionais: histórico e legislação

O conceito de alimentos funcionais, aparentemente tão moderno e revolucionário, não é, na verdade, novo. Novo é o interesse de explorar de forma científica e legislativa esta questão.

As antigas culturas chinesa, indiana, egípcia e grega, em particular, trabalhavam muito com o conceito de comida-remédio ou de alimentos terapêuticos, atribuindo propriedades preventivas de doenças a quase todos os alimentos, bem como reconhecendo as condições adequadas de preparo e consumo dos mesmos (Pimentel et al., 2005).

O termo alimentos funcionais foi primeiramente introduzido no Japão, em meados dos anos 80 (século passado) e refere-se aos alimentos contendo ingredientes que auxiliam em funções específicas do corpo, além de serem nutritivos. Conhecidos como Alimentos para Uso Específico de Saúde (Foods for Specified Health Use - FOSHU). Estes alimentos são qualificados e trazem um selo de aprovação do Ministério de Saúde e Previdência Social Japonês, conforme Arai (1996).

A partir dos anos 90, os alimentos passaram a ser vistos como sinônimos de bem-estar e redução de riscos de doenças. No Brasil, desde o início da década de 90, já existiam, na Secretaria de Vigilância Sanitária, solicitações de análise para fins de registro de diversos produtos até então não reconhecidos como alimentos, dentro do conceito tradicional de alimento. Com o passar dos anos, além do aumento do número de solicitações, aumentou também a sua variedade e os apelos e divulgação nos meios de comunicação desses produtos (Park et al., 1999).

A Vigilância Sanitária, sempre utilizando o princípio de precaução, posicionou-se de forma contrária à aprovação e utilização desses produtos como alimentos. Somente a partir de 1998, depois de mais de um ano de trabalho e pesquisa, contando com a contribuição de várias instituições e pesquisadores da área de nutrição, toxicologia, tecnologia de alimentos e outras, foi proposta e aprovada pela Vigilância Sanitária a regulamentação técnica, para análise de novos alimentos, incluídos os chamados *alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde*.

Os principais objetivos das agências reguladoras de alimentos funcionais são: proteger o consumidor de dano, inclusive, suprimindo declarações enganosas quanto à saúde; garantir segurança dos produtos, particularmente em relação a altas concentrações de constituintes específicos e minimizar o impacto negativo potencial desses produtos sobre a manutenção de uma dieta nutritiva. O consumidor deve ser capaz de confiar nos controles de segurança e eficácia impostos a esses produtos para saúde, o que por sua vez, promoverá a qualidade dos produtos na indústria de alimentos (Shils, 2003).

No Brasil, a Portaria nº 398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, fornece a definição legal de alimento funcional: "todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica".

A regulamentação é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que em 1999 publicou duas resoluções relacionadas aos alimentos funcionais:

- Resolução ANVISA/MS nº 18 de 30/04/1999 (republicada em 03/12/1999): aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas

para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.

- Resolução ANVISA/MS nº 19 de 30/04/1999 (republicada em 10/12/1999): aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem.

Essas resoluções fazem distinção entre alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde, como citado a seguir (Pimentel et al., 2005):

- Alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que uma substância (nutriente ou não) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.
- Alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

## **2.2 Soja na alimentação humana e ação como alimento funcional**

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] tem sido empregada na Ásia como alimento por muitos séculos. No Ocidente, tem sido usada, principalmente, pelo elevado teor de proteínas e lipídios. O Brasil situa-se no segundo lugar na lista de principais países produtores de soja, depois dos Estados Unidos (USDA-Soystats, 2008).

A Tabela 1 apresenta os países que se destacaram na produção mundial de soja entre 2000 e 2007.

**TABELA 1** Países que se destacaram na produção mundial de soja entre 2000 e 2007, conforme (USDA-Soystats, 2008).

País	Produção mundial de soja nos últimos anos (milhões de toneladas)				
	2000	2002	2004	2006	2007
E.E.U.U	75,4	74,3	85,5	86,8	70,4
Brasil	36,5	51,0	53,0	56,0	61,0
Argentina	26,0	35,0	39,0	44,0	47,0
China	15,7	16,4	18,0	16,2	14,3
Índia	5,3	4,4	6,0	7,3	9,3
Paraguai	3,4	3,9	3,8	4,7	7,0
Canadá	-	-	-	3,5	2,7
Outros	9,2	9,1	11,6	9,9	8,2
Total	171,5	194,0	216,9	228,4	219,8

Dos produtos da soja um dos principais e mais comercializados no mundo é o óleo, o qual possui os ácidos graxos essenciais (Trucom, 2005).

A proteína é outra importante fração da soja. A baixa digestibilidade da soja crua, conseqüente à presença de fatores antinutricionais, é resolvida com o processamento térmico e industrial. Quando a Food and Drug Administration (FDA) e a Organização Mundial da Saúde (WHO) adotaram o Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS), em lugar do tradicional Protein Efficiency Ratio (PER), comprovou-se que a qualidade da proteína da soja é semelhante a das proteínas animais (Murphy et al., 1999).

O PER é baseado no crescimento dos animais de laboratório, principalmente roedores. O problema que apresenta o PER é que o requerimento de aminoácidos sulfurados (SAA): metionina e cisteína, para os roedores são

aproximadamente 50% maior que em humanos; fazendo com que esses aminoácidos resultem limitantes (Kuiper et al., 1998).

Porém, o PDCAAS utiliza o score de aminoácidos (baseado nos requerimentos de aminoácidos estimados para crianças de 2 a 5 anos) e um fator de correção para a digestibilidade e, assim, obtém-se um valor que reflete a qualidade da proteína. Por meio deste método ficou demonstrado que a qualidade da proteína da soja é similar à proteína de origem animal, avaliando o perfil de aminoácidos (aceito pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos) (Setchell et al., 2001).

A proteína correspondente à maior parte dos produtos da soja tem um PDCAAS aproximado a 1, a qualificação mais elevada possível (Diel et al., 2001), isso indica que o padrão de aminoácidos assim como a digestibilidade da proteína da soja são bastante bons, sendo adequada, também, para adultos (Brzezinski et al., 1999).

O reconhecimento formal da elevada qualidade da proteína da soja ficou respaldada pela decisão do Ministério de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), que permite que a proteína da soja substitua 100% da proteína animal no Programa Nacional de Almoço Escolar (Murphy et al., 1999).

Para reunir os requisitos para a substituição completa, uma proteína deve ter um PDCAAS não inferior a 80% da proteína do leite de vaca. A eficiência de uma proteína pode ser avaliada, quando utilizada por crianças em crescimento, isto, porque elas necessitam 43% do total de nitrogênio ingerido na forma de aminoácidos essenciais. Os adultos necessitam menos proteínas e mantêm o balanço nitrogenado com 19% desses aminoácidos (Jeejeebhoy, 2000).

Até recentemente, a soja era empregada no mundo ocidental, para prevenção e tratamento da desnutrição em comunidades carentes. Era descrita, por isso, como a carne dos pobres e, para crianças com alergia e/ou intolerância ao leite de vaca (Morais, 2001).

Nos últimos anos, a comunidade científica reconheceu a importância dos fitoquímicos. Assim sendo, a soja foi incluída entre os alimentos funcionais, porque é uma das principais fontes de isoflavonóides (isoflavonas), que são fitoestrógenos (componentes não-esteroidais) derivados de plantas possuidoras de atividade estrogênica. Com base em suas estruturas químicas, os fitoestrógenos são divididos em quatro grupos principais: isoflavonóides, flavonóides, coumestrol e lignanas (De Angelis, 2001).

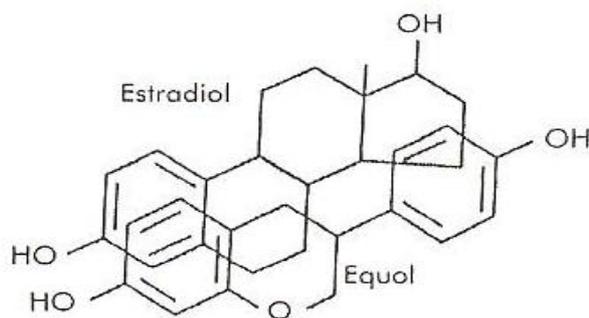
Trabalhos experimentais e clínicos sugerem que as proteínas e isoflavonóides da soja podem proporcionar benefícios em algumas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo doença cardiovascular aterosclerótica, dislipidemias, câncer, diabetes mellitus, osteoporose, doenças renais e manifestações indesejáveis da menopausa. As evidências de que as isoflavonas protegem contra várias DCNT são baseadas em estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos (Messina, 2001).

Em humanos, estudos epidemiológicos mostram maior incidência de alguns tipos de cânceres (mama, próstata e cólon) e doenças cardiovasculares nas populações ocidentais expostas a limitadas quantidades de isoflavonas de soja na dieta, em contraposição às populações orientais, onde o consumo é maior, a diferença estatística é significativa. Na Ásia a baixa incidência de DCNT é atribuída à alta ingestão de isoflavonas, entre 40 e 80 mg/dia, sendo relatado que são consumidas no ocidente, apenas 1 e 3 mg/dia (Kim & Kiom, 2001). Evidência adicional para proteção contra o câncer e doenças cardíacas tem sido verificada em vários modelos experimentais com animais (Messina, 2001).

As isoflavonas podem, também, prevenir a perda óssea pós-menopausa e a osteoporose. Efeitos da genisteína na regulação da secreção de insulina, também têm sido demonstrados. Os mecanismos pelos quais as isoflavonas podem exercer estes efeitos parecem depender, em parte, das suas propriedades

agonistas-antagonistas dos estrógenos (Messina, 2001). Outros mecanismos hipotéticos poderiam derivar de outras propriedades bioquímicas, tais como inibição de certas enzimas envolvidas na síntese de estrógenos e efeito antioxidante (De Angelis, 2001).

Sabe-se que a dose farmacológica ativa dos fitoestrógenos pode mudar de uma formulação para outra ou de uma partida para outra da mesma preparação comercial (nutraceúticos), pois vários fatores interferem neste fato: variedade de soja utilizada, método de extração, clima e latitude da colheita (Couto Filho, 2001). A Figura 1 mostra a semelhança entre as moléculas do estradiol e do equol.



**FIGURA 1** Semelhança entre as moléculas do estradiol (estrógeno) e do equol (fitoestrógeno) (De Angelis, 2001).

Cabe ressaltar que nem todos os produtos à base de soja contêm daidzina ou genistéina (isoflavonas), porque estes compostos lipofílicos são removidos pela extração alcoólica, comumente usada no processamento de produtos de soja (Park et al., 2001).

Alguns pesquisadores acreditam na existência de um sinergismo entre os diferentes compostos bioativos da soja, potencializando sua ação. Ao isolar estes compostos (como no caso das isoflavonas), não só se perde este sinergismo, como também se corre o risco de estar empregando um componente em dose elevada, muito superior àquela encontrada na natureza, podendo causar problemas à saúde (Morais, 2001).

Isoflavona e cumestrol, embora presentes em concentração baixa na soja, estão 70 a 150 vezes maiores no grão germinado do que na soja madura (Liener, 1994). Segundo Jackson et al. (2002) e Murphy et al. (2002) o calor do processamento, a hidrólise enzimática e a fermentação alteram, significativamente, a distribuição dos compostos de isoflavonas na soja e seus produtos. Estes compostos que são doze, dividem-se em dois grupos principais, nove conjugados glicosídeos e três agliconas respectivamente.

Os compostos glicosídeos são pouco hidrolisados pelas enzimas digestivas intestinais de mamíferos; enzimas glicosidases da microbiota intestinal, no intestino grosso, podem hidrolisar isoflavonas glicosídeas e agliconas, e promover sua absorção, formando equol (Park et al., 2001).

É razoável deduzir que a microbiota intestinal influencia profundamente a biodisponibilidade de isoflavonas. A esse respeito, foi reportado, que *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, produzem  $\alpha$ -glicosidase e desempenham importante papel na hidrólise intestinal de numerosos compostos  $\alpha$ -glicosilados encontrados em vegetais, para produzir formas agliconas. Segundo estudos, as isoflavonas agliconas são mais desejáveis nos alimentos que outras, pelo possível aumento na biodisponibilidade, além de maior atividade antioxidante (Park et al., 2001).

Um dos maiores obstáculos do uso da soja como alimento é o desenvolvimento de sabor e aroma desagradáveis. Vários autores (Axerold et al., 1981; Matoba et al., 1985; Davies & Nielsen, 1986 e Hildebrand et al., 1988)

têm mostrado evidências de que constituintes voláteis e não-voláteis são responsáveis por esse sabor e que são desenvolvidos pela hidroxidação de certos ácidos graxos e vários lipídeos, catalisados pela enzima lipoxigenase presente na soja.

As lipoxigenases da soja se apresentam nas suas formas de isoenzimas Lox 1, 2 e 3 (Fox, 1991; Okubo et al., 1992; Fenema, 1993; Furuta, 1996). Muitos estudos estão sendo realizados, visando reduzir o sabor e aroma desagradáveis dos produtos derivados da soja. Uma destas ações seria pela eliminação das isoenzimas, através da eliminação genética das Lox1, Lox2 e Lox3 em soja comercial, ocorrendo reduções significativas na evolução dos compostos de sabores indesejáveis, nos quais, os grãos, quando moídos, apresentam redução de 80% nos níveis de sabor desagradável (Taketa, 2000; Rosenthal et al., 2003).

A medida tradicionalmente utilizada para a inativação das lipoxigenases, antes de sua ação é o uso de calor suficiente ou “branqueamento” (colocar o grão diretamente em água fervente por cinco minutos, eliminar esta água de fervura, resfriar imediatamente e macerar por 8 a 12 horas, para a posterior preparação de extrato de soja) (Ciabotti, 2004).

No Brasil, já existem muitas variedades de soja de sabor e aroma muito mais agradáveis e suaves. A partir do ano 2005 houve disponibilidade no mercado de uma variedade “livre de lipoxigenase” (utilizada neste experimento): o cultivar BRS-213; por esta característica, os produtos derivados dela possuem um sabor muito mais aceitável (Trucom, 2005). Aqueles empreendimentos para popularizar o consumo da soja poderiam encontrar novo impulso a partir destas variedades melhoradas.

Outro tema que afeta diretamente a soja e seus consumidores é a aplicação da Biotecnologia na produção de alimentos. A biotecnologia moderna consiste na manipulação controlada e intencional do DNA, usando técnicas de

engenharia genética. Assim, surgem duas vertentes: transgênicos e variedades melhoradas por cruzamentos seguidos. O cultivar de soja BRS 213 pertence a este último grupo, não é transgênico.

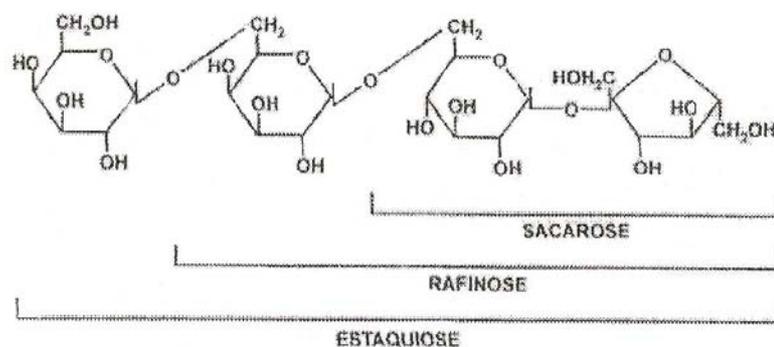
### **2.2.1 Frações bioativas ou funcionais da soja**

As principais frações funcionais da soja são as proteínas, lipídeos e isoflavonas, porém, existem outras também importantes na prevenção de doenças. A seguir se apresentam resumidamente ditas frações e mecanismo de ação conforme trabalhos de De Angelis (2001), e outros autores:

- As proteínas da soja contêm todos os aminoácidos essenciais (a metionina é insuficiente apenas quando a ingestão protéica é inferior a 0,6 g/kg/dia) (Morais, 2001). Não aumenta a velocidade pós-prandial do filtrado glomerular nem o fluxo sanguíneo renal. A qualidade da proteína diminui a perda de cálcio pela urina. Não contém compostos purínicos (responsáveis pela formação do ácido úrico), diminui a proteinúria em indivíduos com afecção renal crônica. Efeito hipocolesterolêmico. A FDA estabeleceu 25g/dia de proteína de soja diária como a quantidade necessária à redução do colesterol (Messina, 2001).
- Os lipídeos da soja são constituídos de ácidos graxos essenciais, o ácido linoléico  $\omega 6$  (50%) e ácido linolênico  $\omega 3$  (9%), que provocam alterações estruturais e funcionais na membrana celular, diminuem a formação de coágulos e pressão arterial, reduzem os níveis de triacilgliceróis e a viscosidade do sangue. Lecitina é o fosfolípido da fração oleosa. É emulsificadora: atua na preservação de artérias, veias e vasos, reduzindo os níveis de colesterol e triacilgliceróis (pelo mecanismo lipófilo-hidrófilo), coadjuvante das funções cerebrais.
- As Isoflavonas são componentes não-esteroidais derivados de plantas possuidoras de atividades estrogênicas. Daidzeína, genisteína e gliciteína.

Quando ingeridos são metabolizados por bactérias no intestino grosso para formar equol. Classificadas como fitoestrôgenos moderados (ação 100.000 vezes mais fracas que os hormônios estrogênicos naturais e sintéticos), demonstraram capacidade antiviral, anticarcinogênica, bactericida, antifúngica, antioxidante, antimutagênica, anti-hipertensiva, antiinflamatória e anti-proliferativa (Knight & Eden, 1996).

- Carboidratos da soja: a) fibras não digeríveis pelo ser humano estão representadas pelos oligossacarídeos: rafinose (1-2%) e estaquiose (2,5-4,5%): promovem a proliferação de bactérias bífidas, reduzem os níveis de metabolitos tóxicos e de enzimas indesejáveis no cólon, prevêm diarreias patogênicas, reduzem níveis de colesterol sérico, reduzem pressão sanguínea, efeito anti-câncer, proteção contra infecções. Agentes de flatulência. ( Figura 2).



**FIGURA 2** Oligossacarídeos rafinose e estaquiose. A sacarose e os oligossacarídeos rafinose e estaquiose são os carboidratos da soja (além da fração de fibras) e constituem substrato de probióticos (Midio & Martins, 2000).

b) Fibra insolúvel (15%) e fibra solúvel (3%): regulam o tempo de trânsito intestinal, aumentam o volume das evacuações, favorecendo o peristaltismo intestinal (combate a constipação), auxiliam no controle da glicemia, na redução dos triacilgliceróis e colesterol sanguíneo e no tratamento da obesidade.

c) Sacarose e traços de frutose( 4-5%): substrato de probióticos.

- Os sais minerais: 5% de sais minerais: cálcio, ferro e zinco. São micronutrientes essenciais, assim como as vitaminas: E (antioxidante), B1, B2, niacina, B6 e ácido fólico.

- As saponinas: são triterpenos de sabor amargo e capacidade de formar espuma, quando em soluções aquosas. Aumentam a absorção de alguns minerais, antioxidante, estimulam o sistema imunológico, inibem a proliferação de células tumorais. Como antinutrente produz modificações na permeabilidade da mucosa intestinal, inibindo o transporte de alguns nutrientes e facilitando a absorção de outros compostos. De modo geral, os teores de saponina da soja são baixos (0,5 a 0,6%) e não causam transtornos.

- O ácido fítico: como antinutriente inibe a absorção de alguns minerais, mas, também possui ação benéfica: reduzir riscos de câncer de cólon e mama, age na prevenção de doenças cardiovasculares pelo efeito de reduzir o colesterol sérico e possui também, ação antioxidante.

A seguir são descritas as principais doenças crônicas-não transmissíveis, que podem ser prevenidas com o consumo de soja e seus produtos.

### **2.2.2 Consumo de soja na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis**

As frações bioativas citadas anteriormente influenciam numa série de doenças crônicas não transmissíveis, as quais são enumeradas brevemente a seguir com seus possíveis mecanismos de ação.

- Dislipidemia: o colesterol em excesso é eliminado pelo aumento da excreção de sais biliares pelas fezes, que o arrasta, ocorrendo assim, aumento do

metabolismo do colesterol como compensação do aumento da eliminação de sais biliares. Ação da lecitina que prevém a arteriosclerose e a trombose, que por sua vez, também arrasta o colesterol. As isoflavonas, atuando com as proteínas da soja mostram maior efeito de redução do colesterol do que de forma isolada (La Justicia Bergasa, 1986).

- No caso da osteoporose a proteína de soja produz menor excreção de cálcio pela urina. Estudo demonstrou que indivíduos que consumiram apenas proteína animal excretaram 150mg de cálcio/dia, e os indivíduos que consumiram proteína de soja excretaram apenas 13mg/dia. A substituição de 15 gramas de proteína de soja diminuiria as necessidades dietárias de cálcio em até 150mg/dia (Messina, 2001). O consumo de 40g/dia de proteína de soja durante seis meses produziu ganho de resistência óssea em mulheres na pós-menopausa. Estudos demonstram o aumento na densidade dos ossos da coluna vertebral e que a densidade óssea, em animais que se alimentaram de proteína de soja, mostrou ser maior que em animais que receberam uma dieta a base de caseína (Messina, 2001; Trucom, 2005).
- Para o câncer de cólon estudos comprovaram o efeito protetor da fibra (oligossacarídeos) contra o câncer de cólon e reto. Fibras conferem maior volume em fluidez fecal, menor tempo de trânsito intestinal, redução de constipação, agressões e envenenamento das mucosas locais (De Angelis, 2001; Messina, 2001; Bennink, 2001).
- Na diabetes, a soja tem sido empregada devido ao conteúdo elevado de fibras, pouca gordura e baixo índice glicêmico. Estudos têm demonstrado que o teor de glicose na urina de pessoas diabéticas que consomem soja é menor do que naquelas que não consomem, sinalizando um aumento da habilidade das células para a absorção da glicose. As fibras solúveis auxiliam na regulação dos níveis de glicose, porque favorecem na liberação mais lenta e gradual deste

açúcar na corrente sanguínea, o que também influi na hipoglicemia (Messina, 2001).

- As isoflavonas previnem enfermidades coronarianas pelo efeito hipocolesterolêmico, mas também podem exercer efeitos cardioprotetores via efeitos diretos sobre os vasos coronários. Exemplo: descobriu-se que a genisteína melhora a função endotelial. Uma das principais causas de aterosclerose é a função endotelial diminuída. Redução da pressão sanguínea. Efeito da lecitina sobre vasos de artérias coronárias. Estudos em animais e “*in vitro*” sugerem que as isoflavonas retardam a progressão de placas de aterosclerose e podem alterar o processo celular envolvido no desenvolvimento de lesões (Maranhão, 2001).

- No câncer de mama estudos *in vitro*, utilizando células humanas têm confirmado os efeitos antiproliferativos de fitoestrôgenos. Mostraram inibir em 18-20% o crescimento *in vitro* de células malignas. Estudos epidemiológicos confirmam a menor incidência de câncer de mama na Ásia. Possível mecanismo de ação: atividade antiestrogênica. Níveis mais baixos de estrogênio (natural ou sintético) geralmente estão associados à melhor saúde da mama da mulher. As isoflavonas competem com o estrogênio natural ao se ligando aos receptores (Messina, 2001; De Angelis, 2001).

- A soja também tem o potencial de reduzir o risco de câncer por meio de mecanismos não hormonais (ação antioxidativa, inibição da atividade de enzimas que controlam o crescimento e a regulação celular). Estudos sugerem que o consumo de soja desde idade precoce, reduz, drasticamente, as probabilidades de desenvolver câncer de mama em etapas ulteriores da vida (o risco de câncer de mama pode depender, em grande medida, dos eventos ocorridos nos primeiros vinte anos de vida) (Messina, 2001; Bennink, 2001).

- Para o câncer de próstata estudos demonstraram que a genisteína desacelera o crescimento do câncer de próstata em camundongos e faz com que

as células cancerosas morram. O possível mecanismo de ação seria pela redução na produção de andrógenos. Efeitos diretos no epitélio da próstata via receptor de estrógeno (ER $\beta$ ), que é o receptor de estrógeno predominante na próstata. Estudos epidemiológicos comprovam menor incidência de câncer de próstata na Ásia. Os níveis de isoflavona nos fluidos prostáticos são mais elevados em homens de países consumidores de soja, em comparação com homens de países de ocidente e, que a concentração de isoflavonas no fluido prostático é aproximadamente o dobro que no soro (De Angelis, 2001, Messina, 2001; Bennink, 2001).

- Para casos de redução do nível de estrogênio (menopausa) estudos concluíram que o consumo de 25 gramas de proteína de soja ao dia, apresenta significativa redução nos sintomas da menopausa tais como: fogachos, suores noturnos, ressecamento de pele e vagina, irritação, ansiedade e depressão, pelo seguinte mecanismo de ação: estrogênico e antiestrogênico; inibição de diversas enzimas chaves na síntese de estrógenos e andrógenos (De Angelis, 2001; Messina, 2001; Han et. al., 2001).
- No caso de transtornos renais não aumenta a velocidade pós-prandial do filtrado glomerular nem o fluxo sanguíneo renal e diminui a proteinúria em indivíduos com afecção renal crônica (Trucom, 2005).

### **2.2.3 Antinutrientes da soja e respectivos mecanismos de ação**

- Inibidores de protease: impedem a tripsina/quimiotripsina (proteases) de atuarem na digestão das proteínas, exigindo síntese constante dessas enzimas, sobrecarregando o pâncreas e causando perda de peso (Liener, 1994), ao inibir a absorção das proteínas impedem o completo aproveitamento dos alimentos protéicos afetando o crescimento.
- Lectinas ou hemaglutininas: são glicoproteínas que se ligam a açúcares nas paredes do intestino danificando-as, permitindo a passagem de compostos

inconvenientes à corrente sanguínea (Liener, 1994). Aglutinam as células sanguíneas, inibem a absorção de nutrientes e o crescimento.

- **Alergênicos:** no uso do “leite de soja” em pediatria verificou-se que 35% dos indivíduos que apresentam alergia à proteína do leite de vaca, apresentam também alergia cruzada ao “leite de soja”. Tem-se sugerido que as proteínas glicinina,  $\beta$ -conglucina e 2S-globulina (mais estável ao calor que as outras frações) poderiam ser as responsáveis (De Angelis, 2001).
- **Antivitamínicos:** afetam a absorção de algumas vitaminas: as lipoxigenases podem oxidar e destruir os carotenos; outros antivitamínicos podem impedir a absorção da vitamina B<sub>12</sub>, D, e E (Trucom, 2005).
- **Goitrogênicos:** a substância presente na soja que tem efeito goitrogênico não é conhecida. Tem sido postulada a excreção de tiroxina nas fezes, quando a dieta possui soja crua (De Angelis, 2001).
- **Taninos:** localizados no tegumento da semente, capazes de reagir com proteínas. Inibem importantes enzimas digestivas, mas, também têm capacidade antioxidante, anticarcinogênica e antimutagênica. De 0,5 a 2%, dependendo da variedade da leguminosa (Liener, 1994; Trucom, 2005).

Obs.: É importante salientar que o tratamento mais eficaz para a eliminação dos antinutrientes termolábeis é o tratamento térmico úmido, mas, existe uma variedade de métodos tais como: germinação, modificação de pH, autoclavagem, torração, esterilização, forneados ou assados, e toda aplicação de calor pelo tempo necessário, maceração, secagem, fermentação e ensilagem que podem reduzir ou eliminar essas substâncias antinutricionais (Liener, 1994). Os problemas se apresentam somente, quando a soja é consumida crua ou inadequadamente processada (Barcelos, 2008).

## **2.3 Bactérias utilizadas na fermentação do extrato de soja para a obtenção do “iogurte” de soja.**

### **2.3.1 Probióticos**

Segundo Fuller (1989), probióticos são suplementos alimentares de microorganismos vivos, os quais beneficiam a saúde dos consumidores, porque incrementam o balanço da microbiota intestinal. Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são considerados os microorganismos probióticos clássicos e atuam em sítios diferentes no trato digestório (Ferreira, 2003).

Os processos de fermentação favorecem a proliferação nos alimentos daqueles microorganismos selecionados, cujas atividades metabólicas e produtos finais são desejáveis (Potter et al., 1999).

As reações, que incluem a carboidratos e produtos similares (fermentações verdadeiras), denominam-se *sacarolíticas*; as degradações dos compostos protéicos, *proteolíticos* ou *putrefativas*; as das substâncias gordurosas, *lipolíticas* (Potter et al., 1999).

Os microorganismos proteolíticos originam com o processo de fermentação, odores e sabores pútridos ou fétidos; exemplo: *Proteus* (bactéria patogênica do intestino) origina um conjunto amplo de compostos nitrogenados de odores pútridos. Os microorganismos lipolíticos geram odores e sabores ranços. Os microorganismos fermentativos ou sacarolíticos transformam os carboidratos em álcool, ácidos e dióxido de carbono. Estes produtos finais não geram aromas ofensivos para os sentidos. Além do mais, os álcoois e ácidos resultantes, inibem aos microorganismos proteolíticos, lipolíticos e patógenos (Potter et al., 1999). Na Figura 3, seguem os produtos finais primários do metabolismo dos microorganismos.



**FIGURA 3** Produtos finais primários do metabolismo de microorganismos (Schwan,2007).

Os probióticos selecionados são, preferentemente, sacarolíticos e são favorecidas sua multiplicação e predominância sobre a microbiota patógena, proporcionando a eles o substrato adequado, visto que, prebióticos na dieta asseguram seu crescimento e viabilidade. Bactérias bífidas podem ser proteolíticas ( Kamaly, 1997; Arunachalam, 1999).

As bactérias nocivas podem formar compostos tóxicos para o hospedeiro. Entre esses compostos estão as substâncias putrefativas (amônia, H<sub>2</sub>S, aminas, fenol, indol, escatol, cadaverina e outros) e ácidos biliares secundários. Essas substâncias podem prejudicar o intestino diretamente e são também parcialmente absorvidos, contribuindo ao longo da vida do indivíduo para o processo de envelhecimento, câncer e outros problemas geriátricos (Mitsuoka, 1992).

Hoje em dia torna-se difícil deixar de apreciar as evidências dos aspectos positivos da predominância de uma microbiota benéfica e seu metabolismo e, particularmente, o papel desse ecossistema na nutrição e saúde do hospedeiro (Holtzapfel et al, 1998; Gibson & Williams, 1999 e Mackie et al., 1999). Os aspectos que são considerados para classificar um microorganismo como probiótico são, conforme Saarela et al. (2000):

#### **2.3.1.1 Aspectos de segurança:**

- Originários do ser humano.
- Isolados do trato digestório de ser humano sadio.
- Histórico de não ser patogênicos.
- Não ter histórico de associação com doenças assim como com endocardites infecciosas ou desordens gastrointestinais.
- Não desconjugar sais biliares (desconjugação de sais biliares ou deshidroxilação seria uma característica negativa no intestino delgado).
- Não carregar genes de resistência antibiótica transmissível (linhagens hospedeiras de elementos móveis, que carregam genes de resistência não deveriam ser usadas como probióticos humanos nem animais).

#### **2.3.1.2 Aspectos funcionais:**

- Resistentes ao suco gastrointestinal e a ácidos.
- Resistentes à bile.
- Aderência ao epitélio do trato gastrointestinal humano e persistência no mesmo.
- Estimulador do sistema imunológico, mas, sem efeitos pró - inflamatórios.
- Antagonistas da atividade de patogênicos como *Helicobacter pylori*, *Salmonellasp*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, e *Proteus*.
- De propriedades antimutagênicas e anticancerígenas.
- Produtor de substâncias antimicrobianas.

### 2.3.1.3 Aspectos tecnológicos:

- Boas propriedades sensoriais.
- Resistência a bacteriófagos
- Viabilidade durante o processamento.
- Estabilidade no produto e durante o armazenamento.

As culturas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidus*, enquadram nesta seleção. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* constituem as mais importantes linhagens probióticas para uso humano (Saarela et al., 2000).

Os *Streptococcus thermophilus* são microrganismos lácticos bioajustadores e são utilizados para que os produtos feitos com culturas probióticas possam atingir uma acidez segura num período aceitável. Os *Streptococcus thermophilus* atuam em simbiose com os *Lactobacillus acidophilus*, a mistura destas duas culturas favorece o crescimento de ambas. (Ferreira, 2003).

O emprego de culturas bioajustadoras têm como finalidade básica: contornar problemas de sabor, aroma e textura, aumentar a taxa de crescimento e diminuir o tempo de fermentação, e, garantir o processo fermentativo, evitando problemas de contaminação (Ferreira, 2003).

No mercado já são reconhecidas as culturas denominadas ABT (*L. acidophilus*, *bifidobactéria* e *S. thermophilus*) (Vinderola et al., 2000), a utilizada neste experimento é uma delas, porém o *Streptococcus thermophilus* é tradicionalmente usado em conjunto com o *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* para fabricação do iogurte (nome oficial do produto a partir de leite de vaca e de nenhum outro), sendo a presença de ambos determinada pela legislação de vários países, inclusive do Brasil (Brasil M.A.A., 2000).

#### **2.3.1.4 Gênero *Bifidobacterium***

As Bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier, sendo, em geral, caracterizadas por serem microorganismos gram-positivos, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios (Sgorbati et al., 1995). Com respeito à sua morfologia, podem ter várias formas que incluem bacilos curtos e curvados, bacilos com a forma de capacete e bacilos bifurcados. Até o século 20 o gênero *Bifidobacterium* inclui 30 espécies, 10 das quais são de origem humana (cáries dentárias, fezes e vagina), 17 de origem animal, 2 de águas residuais e 1 de leite fermentado; esta última tem a particularidade de apresentar boa tolerância ao oxigênio, ao contrário da maior parte das outras do mesmo gênero (Kurmann & Rasic, 1991; Mital & Garg, 1992).

As Bifidobactérias estão inseridas na ordem das actinomicetas, dentro do grupo das bactérias gram-positivas, possuem, também, algumas diferenças notáveis por suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, incluindo os constituintes da parede celular. São organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e lático, na proporção molar de 3:2 a partir de 2 moles de hexose, sem produção de CO<sub>2</sub>, exceto durante a degradação do gluconato. A enzima chave desta via metabólica fermentativa é a frutose-6-fosfato fosfocetolase, a qual pode, por isso, ser usada como marcador taxonômico na identificação do gênero, mas que não permite a diferenciação entre as espécies (Sgorbati et al., 1995).

Além da glucose, todas as Bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono. Estudo recente avaliou 290 estirpes de 29 espécies de Bifidobactérias de origem animal ou humano (Crociani et al., 1994) e apontou a possibilidade de algumas espécies serem capazes de fermentar carboidratos complexos. As Bifidobactérias podem apresentar atividade proteolítica (Kamaly 1997).

Segundo Tamine et al. (1995) as Bífidobactérias crescem em meios que contêm fitona (peptona de soja). A incorporação de Bífidobactéria dentro da cadeia de alimentos pode ser difícil, porque, usualmente, exibe um crescimento fraco em leite de vaca e requer um ambiente anaeróbio (Rasic, 1990), baixo potencial de oxido-redução e a adição de fatores bifidogênicos, para obter os níveis de crescimento desejados (Klaver et al., 1993).

Segundo Shimakawa et al. (2003) o extrato de soja é um excelente veículo para Bífidobactérias, já que sua proteína protege o microorganismo da ação de sais biliares, favorecendo à colonização intestinal. É reportado por Lourens-Hauttingh et al. (2001) que pH menor que 3,6 inibe o crescimento de Bífidobactérias, mas seu crescimento se retarda desde pH 5,0, sendo que em pH entre 5,5 e 5,6 situa-se à faixa ótima de sobrevivência de espécies de Bífidobactérias. Em condições extremas de pH, entre 1,5 e 3,0, espécies de *B. longum* e *B. pseudolongum* sobrevivem melhor que *B. bifidus*.

A sobrevivência das bactérias probióticas, no meio de fermentação, depende das linhagens usadas, da interação entre espécies presentes, das condições de cultivo, da composição química do meio (por exemplo: fonte de carbono), da acidez final, conteúdo de sólidos, promotores e inibidores de crescimento, concentração de açúcares (pressão osmótica), oxigênio dissolvido (especialmente para Bífidobactérias), quantidade de inóculo, temperatura de incubação, tempo de fermentação e temperatura de armazenamento (Lourens-Hattingh et al., 2000).

A faixa de temperatura para a qual se registra crescimento ótimo, oscila entre os 37-45°C, com crescimento máximo a 43-45°C e, praticamente, nenhum crescimento a 25-28°C. Pormenores específicos acerca da sua fisiologia foram extensamente revistos nos trabalhos de Rasic & Kurmann (1983) e Sgorbati et al. (1995). A Tabela 2 apresenta teores de vitaminas do complexo B sintetizadas por microorganismos Bífidobactéria.

**TABELA 2** Síntese de vitaminas por diferentes microorganismos Bifidobactéria, Arunachalam (1999).

Vitamina ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Microorganismos				
	<i>B.adolescentis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B.infantis</i>	<i>B.longum</i>
Tiamina	0,002	0,23	0,09	0,2	0,09
Ácido fólico	0,001	0,058	0,008	0,040	0,02
Piridoxina	0,043	0,046	0,02	0,059	0,42
Nicotina	0,17	1,04	0,39	1,23	0,61
Cianocobalamina	0,35	0,65	0,49	0,39	0,46

Os dados apresentados na Tabela 2 referem-se a fermentações em leite de vaca. As Bifidobactérias são predominantes na microbiota intestinal de pessoas saudáveis, independentemente da idade (Arunachalam, 1999).

### 2.3.1.5 Gênero *Lactobacillus*

Outro dos gêneros que integra o mundo dos agentes probióticos e os Lactobacilos, isolado pela primeira vez por Moro (1900), a partir das fezes de lactantes amamentados ao peito materno. Este investigador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos Lactobacilos intestinais. Estes microorganismos são geralmente caracterizados como gram-positivos incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e aerotolerantes ou anaeróbios. O gênero compreende, neste momento, 56 espécies oficialmente reconhecidas, as mais utilizadas para fins de aditivo dietético são *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*.

Os Lactobacilos mais comuns são bacilos gram-positivos com pontas arredondadas, que, se encontram na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, com tamanho típico de 0,6-0,9  $\mu\text{m}$  de largura e 1,5-6,0  $\mu\text{m}$  de

comprimento. Esta espécie tem a particularidade de ser pouco tolerante à salinidade do meio e ser microaerofílico, com o crescimento em meios sólidos favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio, é homofermentativo. Uma grande parte das estirpes de *L. acidophilus* degrada amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glucose, lactose, maltose, manose, sucrose e esculina (Nahaisi, 1986). Os dados disponíveis apontam para uma melhor utilização da sucrose do que da lactose por parte de *L. acidophilus*.

Como microorganismo homofermentativo, produz quase exclusivamente ácido láctico, a partir da degradação da glucose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (à taxa de 1,8 mol por mol de glucose), embora também possa produzir algum acetaldeído; este último, também pode ser proveniente do metabolismo de compostos azotados (p.ex. treonina), uma vez que *L. acidophilus* exibe uma elevada atividade de treonina aldolase.

*L. acidophilus* também produz vitaminas do complexo B (B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico, riboflavina, niacina, biotina e ácido pantotênico), melhora a absorção de cálcio, produz enzimas como a lactase, que ajuda na digestão da lactose e produz antibióticos naturais, que ajudam na diminuição da microbiota patogêna (Marshall & Cole, 1983).

O crescimento de *L. acidophilus* pode ocorrer até 45°C, estando o ótimo entre 35-40°C. Sua tolerância a acidez varia de 0,3% a 1,9% (acidez titulável), com pH ótimo entre 5,5-6,2 (Kandler & Weiss, 1986).

### **2.3.2 Gênero *Streptococcus***

Segundo Rasic & Kurmann (1983), o *Streptococcus thermophilus* é homofermentativo; termodúrico com temperatura ótima entre 40 e 45 °C; sobrevive à temperatura de pasteurização. Algumas linhagens são produtoras de goma; é pouco proteolítico e não possui atividade lipolítica.

Como já citado os *Streptococcus thermophilus* são culturas lácticas bioajustadoras e são utilizadas para que os produtos feitos com culturas probióticas possam atingir uma acidez segura num período aceitável (Ferreira 2003).

### **2.3.3 Ecologia das *Bifidobactérias* e dos *Lactobacillus***

As Bifidobactérias são bactérias de extrema importância no complexo ecossistema ativo no trato digestório do ser humano e de outros mamíferos, e, também em abelhas (Sgorbati et al., 1995). Tais Bifidobactérias estão distribuídas por diversos nichos ecológicos, sendo a razão em que eles se encontram dependentes da idade e da dieta alimentar.

A proporção numérica diminui com o avanço da idade, acabando por estabilizar no terceiro lugar da lista dos gêneros mais abundantes (o que corresponde aprox. ao 25 % da microbiota intestinal total), depois dos gêneros *Bacteróides* e *Eubacterium* (Finegold et al., 1983) e, segundo Arunachalam (1999), estabiliza no quarto lugar, depois de: *Bacteróides*, *Eubacterium* e *Streptococcus anaeróbicos*.

As Bifidobactérias dominam a microbiota nativa dos recém-nascidos, sendo a sua proliferação estimulada pelos componentes glicoproteicos da K-caseína. Registram-se, igualmente, alterações nos perfis das espécies constituintes ao longo da vida, uma vez que o *B. infantis* e o *B. breves*, típicos dos recém-nascidos, são substituídos nos adultos pelo *B. adolescentis* e o *B. longum*. O *B. longum* é uma espécie que perdura ao longo de toda a vida do hospedeiro. O referido perfil depende, também, da composição da dieta alimentar em termos de fatores bifidogênicos (por exemplo: fibras bifidogênicas), conjugada à própria fisiologia do hospedeiro (Arunachalam, 1999).

Os Lactobacilos estão distribuídos por vários nichos ecológicos espalhados pelo trato digestório (intestino delgado e intestino grosso) e genitourinário, constituindo, de forma semelhante às Bifidobactérias, uma fração importante da microbiota natural. Nenhum dos dois gêneros fica restringido ao intestino grosso como se acredita comumente. Vários fatores ambientais do intestino afetam esta distribuição, incluindo o pH intestinal, a disponibilidade de oxigênio, o nível de substratos específicos, e a presença de secreções e interações bacterianas (Salminen et al., 1996).

Em qualquer um dos dois gêneros (*Bifidobacterium e Lactobacillus*), as espécies correntemente utilizadas em nível tecnológico são não-patogênicas, usufruindo do status Generally Recognised As Safe (GRAS) (Saarela et al., 2000).

#### **2.3.4 Valor terapêutico atribuído aos probióticos**

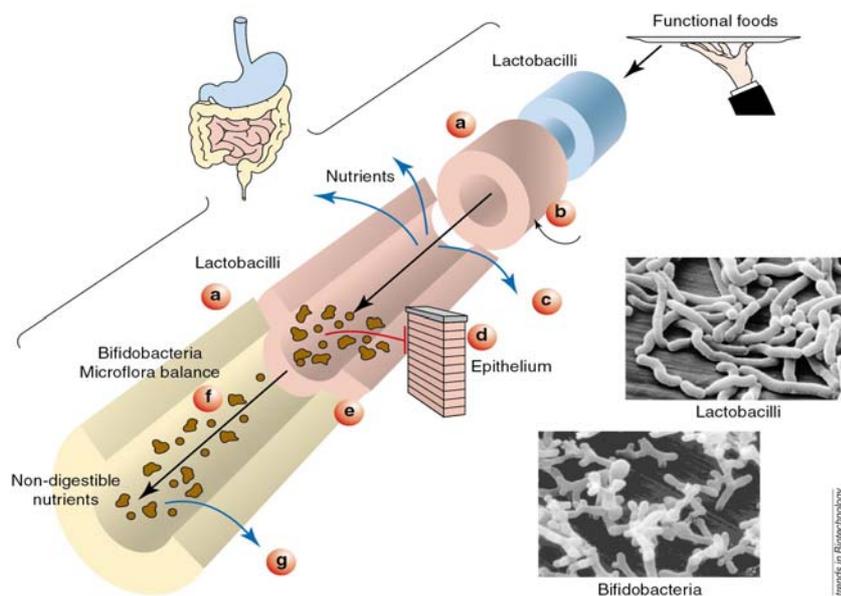
A constatação de efeitos probióticos de aditivos bacterianos viáveis data de muitos anos e tem variado, ao longo do tempo, em função do conhecimento em diferentes momentos.

No princípio do século XX, Tissier defendia que as Bifidobactérias eram importantes para a saúde e nutrição das crianças, incluindo os recém-nascidos afetados por diarréias; tal efeito era atribuído à capacidade das Bifidobactérias removerem bactérias putrefactivas responsáveis pelas desordens gástricas e de restabelecerem ecologicamente como microorganismos intestinais dominantes (Tissier, 1899).

Pouco depois, Metchnikoff atribuía propriedades mágicas ao iogurte, capaz desencadear uma longevidade duradoura, alegando que o consumo regular de grandes quantidades de iogurte, contendo espécies de *acidophilus* resultava numa capacidade alargada de controle de infecções por agentes patogênicos entéricos, associada ao controle da toxemia crônica natural, a qual tem um papel

fundamental no envelhecimento e, conseqüentemente, na mortalidade (Metchnikoff, 1910).

A contribuição das Bifidobactérias para o aumento do valor nutritivo dos alimentos e seu valor terapêutico está sintetizada na Figura 4.



**FIGURA 4** Valor terapêutico dos probióticos (German et al., 1999).

Conforme Figura 4: a) pré e probióticos inibem bactérias patogênicas em vários sítios, desde *helicobacter pylori* na mucosa gástrica a *salmonella sp.* e *clostridia sp.* no intestino; b) múltiplos ingredientes alteram o índice e grau da digestão de nutrientes; c) a absorção de nutrientes e fatores antinutricionais no estômago e intestino é afetada pela presença, forma e atividade dos componentes do alimento funcional; d) pré e probióticos modificam a função barreira do

epitélio intestinal; e) nutrientes: desde vitaminas e minerais aos probióticos, interagem e melhoram a função imunogastrointestinal das células e, via comunicação sistêmica, do sistema imune general; f) pré e probióticos modulam a ecologia da microbiota intestinal; g) produtos de fermentação de fibras ou oligossacarídeos não digeríveis e outros componentes da microbiota não só nutrem o intestino, mas, melhoram, também, a diferenciação, maturação e de maneira general, a saúde das colônias celulares.

**2.3.4.1 Potencial valor terapêutico de alimentos funcionais contendo agentes probióticos e possíveis mecanismos de ação. Resumo dos trabalhos de revisão de Marteau e Rambaud (1993) e Yaeshima (1996); (Plumer, 2004 e Kurmmann & Rasic, 1991):**

- Melhor digestibilidade: aumento da digestão das proteínas, gorduras, e hidratos de carbono; absorção acrescida de cálcio e ferro; produção enzimática de lactase que permite a digestão de lactose (*Lactobacillus* e *Streptococcus thermophilus* produzem esta enzima). Melhor valor nutritivo: níveis elevados de vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos (ex.: metionina, licina e triptofano).
- Ação antagonica contra agentes patogênicos entéricos: competição pelo espaço físico e pelos nutrientes. A exclusão competitiva dos patógenos explicaria a necessidade da administração continuada de elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos. Se os probióticos não se encontram dominantes na microbiota, o grupo dos patógenos (proteus, clostridia e veloneilla) aumentam em número e produzem amônio, aminas e sulfitos hidrogenados causantes da putrefação intestinal, o qual elimina, indiretamente, aos probióticos. Produção de substâncias antibióticas ativas frente aos patógenos (bacteriocinas, lactocina, helveticina, bifidinas). Acidificação do conteúdo do cólon, isto é desfavorável para os patógenos.

- Inativação de certas toxinas liberadas pelos patógenos e balance da microbiota.
- Manutenção da integridade das mucosas intestinais. O epitélio intestinal desempenha um papel de fronteira e barreira imunológica, estabelecendo a interfase entre o conteúdo luminal e as células imunológicas subepiteliais. Qualquer perturbação a esta barreira, desencadeada por antígenos dietéticos, microorganismos patogênicos, agentes químicos ou radiações, conduz a um aumento da permeabilidade intestinal e a alterações estruturais no epitélio, as quais podem ocasionar aumento do fluxo de antígenos e provocar diversos tipos de inflamação ou alergias. Como consequência disto acontece à inibição de infecções intestinais, diverticulitis, diarreia (aguda, por rotavirus, associada aos antibióticos, do viajante, etc.), doenças inflamatórias intestinais associadas em alguns casos, a existências de cancro do cólon; inibição de infecções gástricas por *Helicobacter Pylori* (patógeno responsável da gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico). Obs.: nos casos de diarreia por uso indiscriminado de antibióticos acontece uma diminuição e, às vezes, um extermínio dos Lactobacilos e Bifidobactérias, que são os responsáveis pela resistência à colonização por patógenos, então, acontecem infecções por microorganismos oportunistas como: *Escherichia Coli*, *Clostridium Difficile*, *Klepsiella Oxytoca*, *Perfringens*, *S. Aureus*, *Cândida sp.*, *Salmonella sp.*
- Colonização do intestino: resistência ao ácido gástrico, resistência à lisozima e à tensão superficial baixa do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato digestório.
- Ação anticarcinogênica: a carcinogênese intestinal é mediada por enzimas bacterianas fecais, que ativam os compostos procarcinogênicos, em compostos carcinogênicos; algumas estirpes de *L. acidophilos* e *Bifidobacterium* possuem a capacidade de reduzir os níveis daquelas enzimas, diminuindo, assim, o risco de desenvolvimento de tumores. No caso de nitritos e nitrosaminas

(substâncias carcinogénicas) os Lactobacilos têm capacidade de atuar tanto química como enzimaticamente sobre os nitritos e as Bifidobactérias desdobram as nitrosaminas.

Os sais biliares secundários procedentes da degradação da bÍlis têm relação com o início de cÁncer de cÓlon. Os Lactobacilos reduzem a biotransformaçÓo dos sais biliares e, portanto, diminuem o risco do surgimento deste tipo de cÁncer.

- **AçÓo hipocolesterolêmica:** utilizaçÓo do colesterol no intestino e reduçÓo assim da sua absorçÓo. Aumento da excreçÓo de sais biliares. ProduçÓo de ácidos graxos volÁteis no cÓlon, que podem ser absorvidos e interferir com o metabolismo dos lipÍdeos no fÍgado.
- **ModulaçÓo imunitÁria:** aumento da IgA; induçÓo a um aumento na produçÓo de imunoglobulinas, aumento na ativaçÓo das cÉlulas mononucleares e dos linfÓcitos B; estimulaçÓo do sistema imune.
- **Alergia:** pela estimulaçÓo da imunidade tanto em nÍvel intestinal como em nÍvel geral, o qual implica numa maior produçÓo de anticorpos e uma melhor defesa; isto ajuda na regulaçÓo do sistema imune que se observa nos casos de alergia.
- **Alívio da constipaçÓo:** transformaçÓo do açúcar em lactato e acetato (meio ácido) o qual suprime fermentaçÓo putrefativa dos patÓgenos e, estimula os movimentos peristÁlticos do intestino.
- **DiminuiçÓo de lesÓes hepáticas:** a inibiçÓo dos patÓgenos reduz o trabalho hepático.
- **InibiçÓo da proliferaçÓo de cÉlulas tumorais,** talvez devido à estimulaçÓo do sistema imune.

## 2.4 Prebióticos

Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis pelo ser humano, que afetam benéficamente o hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento ou da atividade de um ou um número limitado de espécies bacterianas já residentes no intestino (Gibson & Roberfroid, 1995).

Para um ingrediente alimentar ser considerado prebiótico, não deve ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato digestório, deve promover seletivamente, o crescimento e/ou estimular a atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde e não de outras bactérias, alterando a microbiota intestinal, em favor de uma composição mais saudável (Rycroft et al., 2001).

Os ingredientes alimentares que atendem a esses requerimentos são principalmente, os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, além de galactooligossacarídeo, lactulose, isomalto-oligossacarídeo, xilooligossacarídeo, gentio-oligossacarídeos e oligossacarídeos de soja, que também possuem efeito prebiótico, com alguns resultados demonstrados *in vitro* e *in vivo* (Rastall & Maitan, 2002 e Gibson & Fuller, 2000).

As substâncias como lactose, xilitol, inulina e frutooligossacarídeos apresentam os seguintes efeitos: alteração do trânsito intestinal (incrementam volume e frequência das evacuações em humanos), redução dos metabolitos tóxicos das fezes; prevenção da diarreia ou da obstipação intestinal, por alterar a microbiota colônica; diminuem risco de câncer; diminuição do nível de colesterol e triacilgliceróis; controle da pressão arterial; incremento na produção e biodisponibilidade de minerais (cálcio, magnésio e ferro); redução do risco de obesidade e diabetes insulino-dependente e redução da intolerância à lactose (Pak, 2006) e (Ferreira et al., 2003).

Os frutooligossacarídeos e a inulina são produtos reconhecidos e usados como ingredientes alimentares e denominados “fibras dietéticas”. A inulina é

produzida naturalmente em mais de 36.000 plantas em todo o mundo, mas, é comumente extraída, industrialmente, da raiz da chicória e por sua vez, os FOS ou oligofrutose são obtidos industrialmente a partir da inulina através de uma hidrólise enzimática parcial. Os FOS, também, são obtidos por síntese, a partir da sacarose por técnicas de transfructosilação (Pak, 2006).

Provavelmente, o efeito nutricional mais conhecido da inulina e os FOS é sua ação de estimular o crescimento das Bifidobactérias no intestino. No desenvolvimento de alimentos simbióticos é necessária a seleção de linhagens de microrganismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis (Ferreira et al., 2003).

O intestino grosso é um ecossistema complexo com mais de 400 espécies diferentes de bactérias. Algumas cepas têm efeitos patogênicos como a produção de toxinas e carcinogênicos, em quanto outras, como os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterias*, são consideradas promotoras da saúde (Pak, 2006).

Doses de 4-5g ao dia são suficientes para estimular o crescimento das Bifidobactérias, com valor calórico entre 1,5 kcal/g. Altos níveis de FOS e inulina podem conduzir a desconforto intestinal, portanto, é necessário respeitar as doses sugeridas pela literatura, (até 20g/dia). Se as doses se dividem em várias porções durante o dia, os sintomas se reduzem e podem desaparecer, inclusive com ingestões diárias de 20-30g/dia (Pak, 2006).

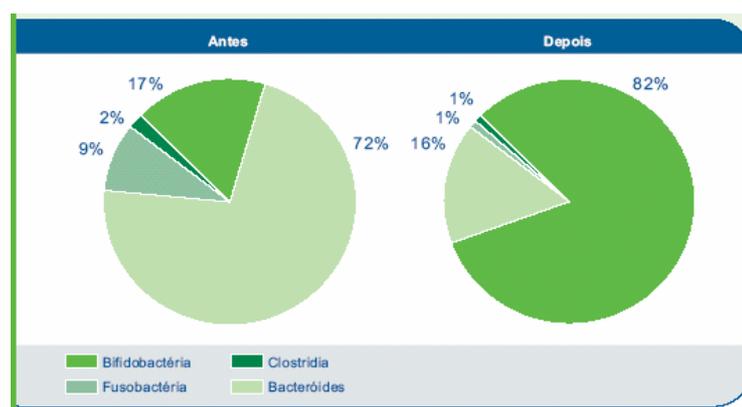
O efeito bifidogênico da inulina e dos FOS foi amplamente comprovado (Gibson & Roberfroid, 1995). Mudanças dramáticas positivas na composição da microbiota intestinal foram demonstradas *in vivo*, em seres humanos, com doses entre 5 e 20g/dia, geralmente em períodos de 15 dias (Pak, 2006).

È importante salientar que a inulina de alto grau de polimerização (>10) fermenta o dobro de lento que a fração de baixo grau de polimerização (<10). A inulina de cadeia mais longa tem o potencial de estimular a atividade metabólica

na parte distal do cólon e é esta que assegura a viabilidade dos probióticos dentro do intestino, uma vez os FOS, às vezes, já são fermentados durante a vida de prateleira do produto (Pak, 2006).

A extensa informação disponível indica que a toxicidade não é um problema no caso da inulina e os FOS, o que permite serem utilizados sem risco, em experimentos *in vivo*, pois, sua inocuidade já foi amplamente demonstrada (Pak, 2006). Outra vantagem de acrescentar estes prebióticos a um alimento, em particular em combinação com bactérias probióticas, é que asseguram a viabilidade das mesmas, durante a vida de prateleira do alimento (Haully, 2005). Os frutooligossacarídeos estão presentes no alho, tomate, cebola, banana, alcachofra, yacón, centeio, cevada, trigo, mel e cerveja (Pak, 2006).

Uma ampla pesquisa demonstrou que a ingestão de quantidades moderadas de RAFTILINE® (nome comercial da inulina utilizada neste estudo) tem como resultado um aumento significativo (cinco a dez vezes) das Bífidobactérias benéficas no intestino. Ao mesmo tempo, a presença de bactérias indesejáveis é reduzida significativamente. Na Figura 5, apresentam-se os efeitos da ingestão moderada de inulina sobre os Bífidos no intestino humano.



**FIGURA 5** Efeitos da ingestão moderada de inulina sobre os Bífidos no intestino humano (Active Food Ingredients - ORAFTI, 1999).

## **2.5 Vitamina B<sub>12</sub>**

### **2.5.1 Vitaminas do complexo B**

As vitaminas do complexo B, agentes vitais controladores, atuam em muitas reações específicas como co-enzimas, parceiras das enzimas celulares-chaves no metabolismo energético e na construção tecidual, assim como na conservação do sistema nervoso (Johnson et al., 2003).

As vitaminas do complexo B são hidrossolúveis, as quais Tiamina (B<sub>1</sub>), Rivoftavina (B<sub>2</sub>), Niacina, Piridoxina (B<sub>6</sub>), Biotina, Ácido Pantotênico, Ácido Fólico e Cianocobalamina (B<sub>12</sub>), ajudam a manter a saúde dos nervos, pele, olhos, cabelos, fígado e boca, assim como a tonicidade muscular do trato digestório. As vitaminas do complexo B podem ser úteis nos casos de depressão e ansiedade. Devem sempre ser ingeridas juntas, mas uma determinada vitamina B pode ser consumida de duas a três vezes mais do que outra no tratamento de um determinado problema (Johnson et al., 2003).

### **2.5.2 Histórico da vitamina B<sub>12</sub>**

Alguns pesquisadores demonstraram que em 1824 já existiam relatos de uma doença (anemia perniciosa), geralmente fatal em 1 a 3 anos após seu diagnóstico. A solução terapêutica surgiu apenas em 1926, quando George Minot e William Murphy demonstraram que a ingestão diária de uma dieta, contendo bife de fígado levemente cozido levava a uma remissão da anemia após alguns meses (Slywitch, 2006).

A vitamina B<sub>12</sub> foi isolada pela primeira vez em 1948, do extrato de fígado, simultaneamente, nos Estados Unidos e na Inglaterra, sendo a última vitamina a ser identificada (Stabler & Allen, 2004). Em 1963 foram descobertas as primeiras funções metabólicas dessa vitamina. Em 1979 as suas funções metabólicas foram elucidadas e a sua síntese concluída. Desde o seu

desenvolvimento histórico dois prêmios Nobel foram recebidos devido aos avanços em pesquisas com essa vitamina (Slywitch, 2006).

### **2.5.3 Caracterização da vitamina B<sub>12</sub>**

A cianocobalamina é um sólido cristalino de cor vermelho intenso, inodoro e insípido. É higroscópica, muito solúvel em água e etanol e insolúvel nos solventes orgânicos. A B<sub>12</sub> é a mais complexa das vitaminas, contém um microelemento, o cobalto que, na B<sub>12</sub> purificada, está ligado a um grupo cianeto, o que lhe confere a denominação de cianocobalamina (Almeida Lima et al., 2001).

Outras cobalaminas com atividade vitamínica reduzida possuem grupos diferentes em lugar do CN. Quando se substitui o radical 5,6 Dimetilbenzimidazol (DBI) pode haver redução ou perda completa da atividade. Portanto, é preponderante na formação das cianocobalaminas ativas, a presença desse radical DBI, que pode preexistir ou ser introduzido (Almeida Lima et al., 2001).

### **2.5.4 Fisiologia da vitamina B<sub>12</sub>**

A vitamina B<sub>12</sub> só se encontra disponível por meio da produção por bactérias. Sua presença nas carnes se deve ao fato de que os animais ingerem ou absorvem (quando produzidas pelas bactérias do seu trato digestório) a vitamina ou pela ingestão de alimentos derivados de outros animais (Champe et al., 2006).

A vitamina B<sub>12</sub>, que se encontra no leite e nos ovos se deve à sua passagem do animal para as suas secreções, enfatizando que 50 a 90% da vitamina ingerida pelos animais é estocada no fígado. As plantas não produzem vitamina B<sub>12</sub>, portanto, se existir vitamina B<sub>12</sub> em qualquer alimento de origem vegetal, isso ocorreu por contaminação bacteriana (Slywitch, 2006).

Nem todas as vitaminas B<sub>12</sub> produzidas por bactérias são iguais. Algumas são muito úteis para os seres humanos e outras são chamadas de análogas, semelhantes à vitamina B<sub>12</sub>, em sua estrutura química, mas que não são utilizáveis pelo metabolismo humano de vitaminas. As análogas da B<sub>12</sub> podem ser produzidas por técnicas de preservação de alimentos, pelo cozimento e pela microbiota intestinal (bactérias intestinais), alimentos como algas marinhas e espirulina também podem contê-las (Slywitch, 2006).

Teoricamente, as vitaminas análogas podem até bloquear a absorção das vitaminas B<sub>12</sub> utilizáveis, porque ocupam alguns espaços de absorção que são limitados para a vitamina B<sub>12</sub> ou apresentam efeitos tóxicos se absorvidas. Por exemplo, nas fezes humanas existem aproximadamente 100 microgramas de vitamina B<sub>12</sub>; 95% são análogas, as quais não são utilizáveis, e 5% são a verdadeira vitamina B<sub>12</sub>, que é ativa para os seres humanos (Mahan & Escott-Stump; 2002).

A vitamina B<sub>12</sub> é absorvida por transporte ativo e com baixa eficiência (cerca de 1 %), por difusão simples (Williams, 1997). Esta última forma de absorção chamada também de difusão passiva é ativada quando existe presença de altas quantidades de vitamina B<sub>12</sub> no intestino, nesse caso, também, altas doses de vitamina B<sub>12</sub> passariam do intestino para o sangue por si só (sem necessidade do Fator Intrínseco) (Combs, 2002).

O mecanismo passivo de absorção é utilizado na terapia para anemia perniciosa, porque nesse caso se administram altas doses de vitamina B<sub>12</sub> ao paciente (>500 mg/dia). O processo ativo é mediado por uma proteína de ligação específica, o fator intrínseco (FI) (enzima mucoproteínica), que está presente nas quatro cobalaminas em um complexo FI-vitamina B<sub>12</sub>, do qual a vitamina é levada para dentro do enterócito num processo que envolve a ligação a um receptor de membrana específico na borda em escova ileal (Combs, 2002).

A absorção de vitamina B<sub>12</sub> começa no estômago, onde as secreções gástricas das proteases e o ácido clorídrico retiram a vitamina B<sub>12</sub> das ligações de peptídeo, que as prendem ao alimento e onde é produzido o fator intrínseco. Para continuar, as proteases do pâncreas também retiram do alimento qualquer vitamina B<sub>12</sub> que não tenha sido separada ainda. Um pâncreas saudável e fortes secreções gástricas são necessários para uma absorção máxima de vitamina B<sub>12</sub> (Slywitch, 2006).

Uma vez que a vitamina B<sub>12</sub> tenha sido desconectada do alimento, ela se conecta com o fator intrínseco, processo que é possível unicamente em pH > 6, presença de cálcio e componentes da bile. Ela então vai para específicos locais de recepção na parte do intestino delgado conhecida por íleo (últimos 60 cm) e é então, absorvida pelo sistema (Futerleibb & Cherubini, 2005). Após a absorção, a cianocobalamina é levada pela circulação para tecidos periféricos ligada a proteínas plasmáticas. Nos seres humanos, cerca de três quartos das cobalaminas no plasma estão ligadas inespecificamente a glicoproteínas chamadas de proteínas R, de importância fisiológica desconhecida (sua ligação à vitamina B<sub>12</sub> pode ser casual).

A ligação específica da vitamina B<sub>12</sub> ocorre com duas proteínas carregadoras, as transcobalaminas (TC) I e II. A captura celular de vitamina B<sub>12</sub> parece ser mediada por um receptor específico de TC, que internaliza o complexo TC-vitamina. Após a degradação lisossômica de TC, a vitamina livre é liberada para ligação a enzimas dependentes de vitamina B<sub>12</sub> (Williams, 1997).

Um mecanismo adicional para manter um alto nível de vitamina B<sub>12</sub> no sistema é que grandes quantidades são secretadas pelo fígado para a bile. Normalmente, absorve-se a maior parte da vitamina B<sub>12</sub> ativa para os seres humanos de volta para o sistema através do íleo (sistema entero-hepático). Neste processo, vitaminas B<sub>12</sub> análogas, não desejadas, são excretadas (Williams, 1997).

Há um limite de absorção para quantidade de vitamina B<sub>12</sub> ingerida em uma única refeição; a explicação deve-se ao fato de que os transportadores do Fator Intrínseco + B<sub>12</sub> ficam saturados e não conseguem absorver mais do que a oferta. Portanto, é recomendável distribuir em várias refeições o consumo desta vitamina, levando em conta que, a capacidade de absorção volta ao normal, após 4 ou 6 h da primeira ingestão (Slywitch, 2006). Em indivíduos adequadamente nutridos, a vitamina B<sub>12</sub> é armazenada em quantidades apreciáveis (~2.000µg), principalmente no fígado, que tipicamente acumula um estoque substancial, por cerca de 5 a 7 anos, a maior parte na forma de adenosilcobalamina (Slywitch, 2006).

A vitamina B<sub>12</sub>, quando isolada como um único fator, é altamente mutável. Quando é colocada em uma multivitamina, por exemplo, a vitamina B<sub>12</sub>, freqüentemente muda para um estado análogo e não é mais utilizável para consumo do corpo. Devido ao fato de a vitamina B<sub>12</sub> dissociar-se em análogas, quando em uma multivitamina, é aconselhável que, quando se for tomar um suplemento de vitamina B<sub>12</sub>, este suplemento seja tomado como um suplemento separado de uma só vitamina, e não em uma multivitamina, sendo a forma injetável, mais segura (Williams, 1997).

#### **2.5.5 Funções da vitamina B<sub>12</sub>**

O ácido fólico possui estreita relação com a vitamina B<sub>12</sub>, já que esta última é responsável pelo funcionamento normal do primeiro. O ácido fólico desempenha um papel-chave no metabolismo dos grupos de um carbono, é essencial para a biossíntese de vários compostos. O tetraidrofolato (precursor do ácido fólico) recebe um fragmento de um carbono de doadores, e os transfere para intermediários na síntese de aminoácidos, purinas e timina- pirimidina encontrada no DNA (Champe et al., 2006).

A deficiência de vitamina B<sub>12</sub> leva, hipoteticamente a uma deficiência de formas de tetraidrofolato, necessárias para a síntese de purinas e timina, resultando nos sintomas da anemia megaloblástica, em outras palavras, quando há carência de B<sub>12</sub>, o ácido fólico não consegue ingressar na célula, assim, esta aumenta de tamanho, mas não consegue duplicar o DNA, ou seja, não ocorre divisão celular (Champe et al., 2006).

A vitamina B<sub>12</sub> é antianêmica por excelência, basicamente utilizada para a formação do sangue e manutenção do sistema nervoso. Constituem funções da vitamina B<sub>12</sub> as duas formas de coenzima: adenosilcobalamina (para metilcalonil-CoA mutase e leucina mutase) e metilcobalamina (para metionina sintetase). Estas formas de vitamina desempenham papéis importantes no metabolismo de propionato, aminoácidos e carbonos simples respectivamente. Estes passos são essenciais para o funcionamento normal do metabolismo de todas as células, especialmente àquelas do trato gastrointestinal, medula óssea e tecido nervoso (Champe et al., 2006).

Constitui um cofator e uma coenzima em muitas reações bioquímicas, como síntese de DNA (Andrés et al., 2004; Stabler, 1995), que é produzida durante a degradação de alguns aminoácidos e de ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono.

#### **2.5.6 Ingestão Dietética de Referência da vitamina B<sub>12</sub>**

As Ingestões Dietéticas de Referência (DRI) foram estabelecidas para a vitamina B<sub>12</sub> as quais incluem a Necessidade Média Estimada (EAR) e Ingestão Dietética Recomendada (RDA) (Tabela 3)

**TABELA 3** Necessidade Média Estimada (EAR) e Ingestão Dietética Recomendada (RDA) para vitamina B<sub>12</sub> (Food and Nutrition Board, 1998).

Estágio de vida	Vitamina B <sub>12</sub> (µg/dia)	
	EAR	RDA
0 - 6 meses	ND	0,4
7 -12 meses	ND	0,5
1 - 3 anos	0,7	0,9
4 - 8 anos	1	1,2
<b>HOMENS</b>		
9 - 13 anos	1,5	1,8
14 -18 anos	2	2,4
19 - 30 anos	2	2,4
31-50 anos	2	2,4
51-70 anos	2	2,4
> 70 anos	2	2,4
<b>MULHERES</b>		
9 - 13 anos	1,5	1,8
19 -30 anos	2	2,4
19 a 50 anos	2	2,4
31-50 anos	2	2,4
51-70 anos	2	2,4
> 70 anos	2	2,4
<b>Gestantes</b>		
≤18 anos	2,2	2,6
19-30 anos	2,2	2,6
31-50 anos	2,2	2,6
<b>Nutrizes</b>		
≤18 anos	2,4	2,8
19-30 anos	2,4	2,8
31-50 anos	2,4	2,8

ND=não determinado; EAR=necessidade média estimada; RDA= ingestão dietética recomendada

### **2.5.7 Fontes de vitamina B<sub>12</sub>**

A vitamina B<sub>12</sub> é sintetizada por bactérias, porém a vitamina produzida pela microbiota no cólon não é absorvida; colônias de bactérias no intestino delgado podem produzir quantidades significativas (Ferreira, 2003).

A vitamina B<sub>12</sub> é, entretanto, encontrada em tecidos de animais que necessitam de fontes dietéticas da vitamina, para suportar as funções críticas na divisão celular e crescimento. Os alimentos de origem vegetal contêm a vitamina apenas por meio da contaminação ou da síntese bacteriana (Champe et al., 2006).

Muitas pessoas acreditam que os alimentos fermentados contêm vitamina B<sub>12</sub> o suficiente para atender suas necessidades; entretanto, essa teoria não é suportada pela análise. Seis amostras de tempeh (um produto fermentado de soja) foram analisadas e as concentrações de vitamina B<sub>12</sub> foram desprezíveis (Specker, 1988). Em contraste, alguns vegetais marinhos cozidos continham vitamina B<sub>12</sub> na mesma proporção que fígado bovino, mas, a B<sub>12</sub> das algas é da forma análoga (ou forma corrinoide), portanto, nem as algas e nem os produtos fermentados de soja podem ser considerados fontes confiáveis de B<sub>12</sub> (Slywitch, 2006).

Os indivíduos que consomem dietas estritamente vegetarianas, em particular após 5 a 6 anos, igualmente mostram níveis circulantes menores da vitamina B<sub>12</sub>, a menos que suplementem com a vitamina. Isto não é verdade para os ovolactovegetarianos, cujas dietas incluem fontes alimentares de vitamina B<sub>12</sub> (Thorogood, 1995).

Aproximadamente 70% da atividade da vitamina é conservada durante o cozimento da maioria dos alimentos; entretanto, quantidades apreciáveis da vitamina podem ser perdidas, quando o leite e sub-produtos são pasteurizados ou evaporados (Slywitch, 2006).

A Tabela 4 apresenta alguns alimentos fonte de vitamina B<sub>12</sub>.

**TABELA 4** Fonte de vitamina B<sub>12</sub> em alimentos (Combs, 1992)

Alimento	Vit. B <sub>12</sub> µg .100g <sup>-1</sup>	Alimento	Vit. B <sub>12</sub> µg.100g <sup>-1</sup>
<b>Carnes:</b>		<b>Peixes e frutos do mar</b>	
Bife	1,94-3,64	Arenque	4,3
Bife de rim	38,3	Salmão	3,2
Bife de fígado	69-122	Truta	7,8
Frango	0,32	Atum	2,8
Fígado de frango	24,1	Marisco	19,1
Presunto	0,8	Ostra	21,2
Porco	0,55	Lagosta	1,28
Peru	0,369	Camarão	1,9
<b>Lácteos:</b>		<b>Outros:</b>	
Leite	0,36	Ovo inteiro	1,26
Queijo	0,36-1,71	Ovo branco	0,09
Iogurte	0,06-0,62	Gema de ovo	9,26
<b>Vegetales, grãos, frutas:</b> não contém			

### 2.5.8 Deficiência da vitamina B<sub>12</sub>

A deficiência de vitamina B<sub>12</sub> causa divisão celular prejudicada particularmente nas células de divisão rápida, da medula óssea e mucosa intestinal, resultando de síntese interrompida de DNA (Thompson et al., 1989). Quando a vitamina é deficiente, ácidos graxos anormais acumulam-se e são incorporados às membranas celulares, incluindo as do sistema nervoso. Isso pode contribuir para algumas das manifestações neurológicas da deficiência da vitamina B<sub>12</sub> (Champe et al., 2006; Flicker, 2004).

A redução resultante na taxa mitótica resulta em células anormalmente grandes e uma anemia característica (anemia megaloblástica). A deficiência de cianocobalamina produz outra síndrome clínica, a neurológica. As anormalidades neurológicas se desenvolvem com um início muito mais tardio em cerca de um quarto das pessoas com anemia megaloblástica. Estas envolvem

neuropatia progressiva com desmielinização nervosa, começando periféricamente e progredindo para o centro. Os sintomas incluem entorpecimento, formigação e queimação dos pés e rigidez e fraqueza generalizada das pernas (Carmel et al., 1999). Outros sintomas neurológicos incluem perda da memória e demência (Combs, 1992).

Apesar de ser verdadeiro que o consumo prolongado (vários anos) de dietas vegetarianas estritas sem suplementação da vitamina B<sub>12</sub>, leva tipicamente a níveis circulantes muito baixos da vitamina, os sinais clínicos entre tais indivíduos parecem ser raros e podem não se manifestar por vários anos, exceto entre bebês amamentados no peito (Pennington, 1998).

A deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, frequentemente está acompanhada dos seguintes sintomas: 1) uma tonalidade amarelo- limão resultante da anemia concorrente e icterícia devido à eritropoiese ineficaz; 2) uma língua vermelha, lisa carnuda; e 3) distúrbios neurológicos.

#### **a) Causas de deficiência da vitamina B<sub>12</sub>**

Cerca de 60% dos casos de deficiência de vitamina B<sub>12</sub> resultam da má-absorção da cianocobalamina a partir da dieta, entre 15% e 20% são decorrentes de anemia perniciosa e os demais estão associados à dieta insuficiente e as doenças hereditárias do metabolismo da cianocobalamina (Andrés et al., 2004).

A anemia perniciosa, também conhecida como doença de Biermer, é um processo auto-imune caracterizado pela destruição da mucosa gástrica, que constitui causa clássica de deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e pode resultar da atrofia das células parietais gástricas associadas ao envelhecimento (por isso é comum em idosos), por deficiências hereditárias na síntese de fator intrínseco ou por incapacitação imunológica de fator intrínseco (Toh et al., 1997). Para Pruthi & Tefferi (1994), os casos de deficiência de B<sub>12</sub> decorrentes de anemia perniciosa podem chegar a uma prevalência de 50%.

A deficiência de absorção de vitamina B<sub>12</sub> também pode ser causada por parasitas como o *Diphyllobothrium latum*, que é encontrado em peixes.

O parasita, ao infestar o hospedeiro humano, é capaz de retirar a vitamina do intestino delgado e constitui uma causa rara de deficiência de vitamina B<sub>12</sub>. Geralmente, é necessário um longo período de infestação para que ocorra depleção significativa, com conseqüente anemia megaloblástica. A parasitose tem sido relatada na Finlândia, na Rússia, na Escandinávia, na região dos Grandes Lagos nos Estados Unidos, no Japão e no norte da Europa (Stabler & Allen, 2004).

Existem medicamentos, condições sistêmicas e fatores comportamentais que também interferem no metabolismo da vitamina B<sub>12</sub>, da homocisteína e do ácido fólico. Conforme dados obtidos em estudo da Sociedade Germânica, Austríaca e Suíça de homocisteína, drogas como metformin, omeprazol, levodopa e ciclosporina A, causam elevação nos níveis de homocisteína no plasma. Condições sistêmicas como psoríase, leucemia linfocítica aguda, artrite reumatóide, hipotireoidismo, deficiência renal e fatores comportamentais como tabagismo, alcoolismo e hábito de ingerir café contribuem para o aumento da homocisteína plasmática (Stanger et al., 2007).

#### **b) Manifestações clínicas**

Anos de absorção inadequada são necessários para o esgotamento das reservas de B<sub>12</sub> do organismo, mas, a partir desse fato, a anemização é rápida. Os sinais podem ser glossite, parestesia das extremidades e deterioração mental irreversível (Faillace, 2007). Depressão, demência e declínio da função cognitiva estão freqüentemente associados à deficiência de folato e vitamina B<sub>12</sub> (Wolters et al., 2004).

Já as manifestações bucais da deficiência de B<sub>12</sub> podem consistir em úlceras aftosas, que, embora sejam freqüentes nesses pacientes, também podem estar associadas a fatores imunológicos, trauma local, estresse, níveis hormonais,

história familiar, hipersensibilidade a alimentos e infecções (Weusten, 1998). Os autores descreveram três casos de pacientes com úlceras aftosas e deficiência de B<sub>12</sub>, que exibiram remissão das lesões após a administração da vitamina.

Jenkins et al. (1977) investigaram a possibilidade de associação entre infecção por *Candida albicans* e níveis sanguíneos de ferro, ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>, por meio de um estudo retrospectivo com 108 pacientes. Os autores verificaram que a deficiência desses componentes, por si só, não promove crescimento de *Candida albicans*, mas facilita a invasão epitelial por hifas do fungo.

A queilite angular é uma condição inflamatória, aguda ou crônica, da comissura labial, associada à infecção por *Candida sp.*, estafilococos e estreptococos. Entretanto, deficiência de ferro, anemia, deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e diminuição da dimensão vertical de oclusão são fatores que também participam da etiopatogenia da condição (Webb, 1998).

As manifestações clínicas decorrentes da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> podem ter origem em alterações do DNA. O ácido fólico é um componente fundamental na prevenção de rupturas cromossômicas e hipometilação do DNA, mecanismo de reparo cromossômico que é comprometido quando a concentração de vitamina B<sub>12</sub> é baixa (Zittoun, 1999).

Outros tipos de manifestações que ocorrem na deficiência podem ser ateroma (acúmulo de placas de gordura nos vasos sanguíneos), defeito de formação do tubo neural (alteração que faz com que crianças nasçam com sérias alterações na coluna vertebral e paralisia das pernas irreversível), esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado). A falta de B<sub>12</sub> é um fator de risco para doenças cardíacas (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral), (Slywitch, 2006).

Quando há falta de B<sub>12</sub>, ocorre aumento de uma substância chamada homocisteína, que é fator de risco independente (não precisa se associar a nenhum outro fator de risco) para doenças cardíacas (Specker, 1988).

O diagnóstico de deficiência de B<sub>12</sub> não pode ser realizado baseado apenas nos sinais e sintomas de um indivíduo. Muitos estudos demonstraram que cerca da metade dos indivíduos que têm a vitamina B<sub>12</sub> em níveis baixos no sangue não apresentam sintomas consideráveis. Exames laboratoriais que podem ser utilizados conforme (Slywitch, 2006):

- Hemograma: para demonstrar a anemia e o tamanho da célula. Se a anemia se torna mais grave ocorre diminuição das células de defesa (neutropenia) e das plaquetas (trombocitopenia).
- Reticulócitos: são as células vermelhas jovens. Na deficiência de B<sub>12</sub>, os seus níveis sanguíneos ficam reduzidos (para o grau da anemia).
- Ácido metilmalônico: na deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ocorre aumento do ácido metilmalônico (esse aumento não ocorre na deficiência de folato). Esse aumento pode ser detectado no sangue e na urina.
- Homocisteína: se eleva na deficiência de B<sub>12</sub> (e também na de ácido fólico e piridoxina).
- Dosagem de ácido fólico no sangue: pode ser usado na dúvida da etiologia da anemia (B<sub>12</sub> ou ácido fólico).

**c) Populações de risco:**

- Idosos: muitos acreditam que a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> seja um distúrbio comum nos idosos (Carethers, 1988). Neles ocorre com maior frequência má absorção da cobalamina alimentar por causa da pouca secreção de ácido clorídrico no estômago (Slywitch, 2006).

Muitos estudos têm relacionado à deficiência de vitamina B<sub>12</sub> com alterações neurológicas, sendo que o aumento do nível plasmático de

homocisteína, segundo Seshadri (2002) é um forte fator independente de risco para o desenvolvimento de demência e doença de Alzheimer.

Estudos com idosos que tinham neuropatia (doença dos nervos) demonstram que eles podem ter hemograma normal e concentração sanguínea de vitamina B<sub>12</sub> normal. No entanto, a concentração de ácido metilmalônico estava elevada e se reduzia após a oferta de vitamina B<sub>12</sub>. Isso sugere que idosos devem ser muito bem avaliados, pois podem estar com deficiência mesmo com alguns exames dentro dos valores normais; preventivamente indivíduos após dos 50 anos deveriam receber suplementação de vitamina B<sub>12</sub>, incluindo os que possuem uma dieta com carne (Slywitch, 2006 e Thompson & Freedman, 1989).

- Vegetarianos estritos: são um grupo particularmente de risco visto que, além de suprimirem carne e peixe da dieta, não ingerem ovos, leite ou produtos derivados do leite (Hillman, 1991).

Como a necessidade de vitamina B<sub>12</sub> é pequena e ela é tanto armazenada quanto reciclada no corpo, os sintomas da deficiência podem demorar anos para aparecer. Ingestão com a dieta vegetariana: 0,25 a 0,5 µg/dia. Dietas, fornecendo 0,5 µg /dia de vitamina B<sub>12</sub> ou menos estão associadas com alta proporção de pessoas com níveis sanguíneos mais baixos dessa vitamina.

- Indivíduos com distúrbios de absorção: podendo ter insuficiência de vitamina B<sub>12</sub> por apresentar hipocloridria, comum em pacientes que tiveram o estômago retirado em cirurgias (tumores, por exemplo, ou obesidade).

- Indivíduos com doenças auto-imunes que alteram o funcionamento do Fator Intrínseco, criando anticorpos, que destroem ou atrapalham a absorção desse fator, ocorrendo anemia perniciososa.

- Infestação de bactérias no intestino delgado, onde as bactérias intrusas competem com o nosso organismo para consumir a vitamina B<sub>12</sub>, ocorrendo em pessoas com divertículos, fistulas ou inflamações intestinais.

- Pacientes com AIDS possuem menor teor de vitamina B<sub>12</sub>, pela falha

de absorção do Fator intrínseco+B<sub>12</sub> no intestino. Pacientes com ressecção intestinal podem desenvolver deficiência, (Slywitch, 2006).

- Alcoólatras: por insuficiência pancreática dificulta-se a ligação da vitamina B<sub>12</sub> com o Fator Intrínseco, (Slywitch, 2006).
- Populações carentes: déficit de B<sub>12</sub> presente por alimentação inadequada, conseqüência da baixa renda econômica.

#### **d) Tratamento de deficiência de vitamina B<sub>12</sub>**

A ação da vitamina B<sub>12</sub> no organismo é muito ampla e sua dosagem sérica é um exame laboratorial importante na avaliação do paciente, já que permite o diagnóstico da deficiência antes do aparecimento da anemia e dos sintomas neurológicos (Slywitch, 2006).

Quem consegue absorver vitamina B<sub>12</sub> pode ser tratado com vitamina B<sub>12</sub> por via oral, mas, não há problema em repor a vitamina de forma injetável. Quem tem problema de absorção de B<sub>12</sub> deve recebê-la de forma injetável (intramuscular) (Slywitch, 2006).

O tratamento mais comum consiste em injeções intramusculares ou subcutâneas de 50 a 100 µg/dia de vitamina B<sub>12</sub> por uma ou duas semanas. Depois da resposta é reduzida a freqüência, até que se conserve a remissão indefinidamente com doses mensais de 100µg intramuscular (Mahan & Escott-Stump, 2002).

Como medida preventiva, nos casos das populações de risco, é indicada a aplicação intramuscular da vitamina B<sub>12</sub>, uma vez por ano na dose de 5000µg (dividindo as aplicações em duas vezes, cada uma de 2500µg, com 5 dias de espaçamento entre uma e outra) (Mahan & Escott-Stump, 2002).

Também, pode ser feito um esquema terapêutico por via oral de 1000 µg diários de cianocobalamina durante um mês; doses entre 125 e 500 µg/dia podem ser administradas em casos de deficiência nutricional (Andrés et al., 2004). A reposição parenteral da vitamina B<sub>12</sub> promove, em alguns pacientes,

significativa melhora das condições mentais (Faillace, 2004). Em casos de anemia perniciosa, o tratamento com doses mensais de 1000 µg de cianocobalamina deve ser mantido pelo resto da vida do indivíduo.

Pode ser realizada, também, uma intervenção nutricional, através de uma dieta rica em proteína (1,5g/Kg de peso corpóreo) tanto para a função hepática quanto para a regeneração (Andrés et al., 2004).

Como os vegetais folhosos verdes contêm ferro e ácido fólico, a dieta deve conter quantidades cada vez maiores destes alimentos. Fígado deve ser incluído com frequência, devido ao seu bom conteúdo de suprimento de ferro, vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico e outros nutrientes importantes. Carnes (especialmente carnes bovina e suína), ovo, leite e produtos lácteos são particularmente ricos em vitamina B<sub>12</sub>, embora o conteúdo de colesterol também deva ser considerado (Stabler, 1995).

As seguintes drogas reduzem a absorção da B<sub>12</sub>: colchicina, neomicina anticoncepcionais (usados por via oral). O álcool também reduz a sua absorção. Não há relato de toxicidade pelo uso excessivo de B<sub>12</sub> (Stabler, 1995).

#### **2.5.9 Estabilidade da vitamina B<sub>12</sub>**

Na zona de pH 4-6 é muito estável nas temperaturas elevadas. O pH superior (alcalinos) e presença de agentes redutores (ácido ascórbico, SO<sub>2</sub>) podem acarretar grandes perdas (Belitz & Grosh, 1988).

A cianocobalamina é destruída na presença de pH>9, oxigênio, íons metálicos (Cu, Mo, Mn) e agentes redutores (ascorbato) (Slywitch, 2006). O valor de pH ideal para aquecimento em solução é 5,5 (Almeida Lima et al., 2001).

#### 2.5.10 Bactérias que sintetizam vitamina B<sub>12</sub>

Históricamente, o primeiro microorganismo descoberto que produz vitamina B<sub>12</sub> foi o *Streptomyces griseus*. Rickes et al. (1948b) citado por Medical memoranda, (1950), obtiveram material cristalizado das *Streptomyces griseus* e a partir dessa informação Glaxo Laboratories há preparado concentrações do metabolismo fluido de cultivos de *Str. Griseus* e este material têm sido utilizado em casos de anemia perniciosa com ótimos resultados (Medical memoranda, 1950).

Na atualidade, as *Streptomyces griseus* têm sido substituídas na biotecnologia, principalmente, pela bactéria *Pseudomonas denitrifican*, *Propionibacterium shermanii* e *Propionibacterium freundenreichii*. Observa-se que Kureha (1985) citado por Almeida Lima et al. (2001), entre outros, aplicou a engenharia genética, conseguindo cepas híbridas e altamente produtivas (como o *Rhodopseudomonas protamicus*). Neste caso, o rendimento chegou a 135 mg/L, após 90h, sem adição de DBI ou estimulantes. Existem ainda referências a bom rendimento em meios enriquecidos com determinados sais e/ou nutrientes e usando *Azotobacter chroococcus* ou *Eubacterium limosum*, entre outros (Almeida Lima et al., 2001). É importante salientar que as bactérias citadas são utilizadas pela Biotecnologia para produção industrial da vitamina B<sub>12</sub>.

Taranto et al. (2003) comprovaram que o *Lactobacilo Reuteri CRL1098* é capaz de produzir cianocobalamina. Esta bactéria é um componente da microbiota gastrintestinal de humanos, aves domésticas, suínos e outros animais. Gêneros *Pseudomonas* e *Klebsiella* podem produzir quantidades significativas de vitamina B<sub>12</sub> no intestino delgado (Goldin et al., 1994).

*Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. longum* são capazes de sintetizar vitamina B<sub>12</sub>, em diferentes proporções, entre outras vitaminas do complexo B, podendo aumentar a biodisponibilidade dessas vitaminas no intestino humano, Ferreira, (2003). E varias espécies de bactérias

do gênero *Lactobacillus* também produzem a vitamina B<sub>12</sub> (Marshall & Cole, 1983).

#### **2.5.11 Novas áreas de estudos sobre as bactérias**

Novas disciplinas da medicina dedicam-se atualmente ao estudo da microbiota intestinal, são elas: a metabolômica, que estuda os metabolitos que o processo celular deixa para trás e a metabologia, que caracteriza as mudanças metabólicas que um sistema biológico experimenta em resposta a estressores. O pai destes novos ramos, o bioquímico americano Jeremy Nicholson, espera criar novas ferramentas para diagnóstico de doenças e novos alvos para remédios. No futuro, eliminar doenças pode remeter a um tratamento da microbiota intestinal. O corpo e sua microbiota intestinal produzem substâncias químicas com informações de saúde, as quais podem ser interpretadas e servem de sinal para detectar doenças. Entre outras possibilidades está sendo ressaltada a de modular, voluntariamente, a microbiota intestinal (Nicholson, 2008).

#### **2.5.12 Dosagem de vitamina B<sub>12</sub> em alimentos por CLAE**

As vitaminas do complexo B têm sido tradicionalmente determinadas por análises microbiológicas (AMB). Entretanto, aplicações de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) têm surgido na literatura nos últimos vinte anos para análise de vitaminas do complexo B. Nem as AMB, nem a HPLC oferecem ao analista, a solução para todos os problemas (Vilas Boas, 2000).

As vantagens no uso da CLAE, para determinação de vitaminas, incluem rapidez, alta sensibilidade e exatidão, mesmo para analitos presentes em quantidades baixas e em matrizes complexas, tais como alimentos (Macrae, 1990), além de análises diretas sem derivação, determinação simultânea de vários compostos em uma análise única e resolução de isômeros (Polezelo &

Rizzolo, 1986). Metodologias que fazem a utilização da CLAE, para a determinação de vitaminas em alimentos, ainda estão sendo estudadas.

O sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência pode ser utilizada na análise de qualquer substância solúvel no solvente utilizado como fase móvel. CLAE pode ser definida como um processo de migração, em que os componentes da amostra são seletivamente retidos pela fase estacionária. Esta fase pode ser de material sólido ativo ou líquido imobilizado (Araújo, 1999).

A determinação de vitaminas em alimentos, envolve a extração de compostos complexos e, frequentemente lábeis, em concentrações da ordem de ppm, a partir de matrizes orgânicas complexas. Assim, o procedimento de extração das vitaminas, geralmente envolve extensiva hidrólise ácida do alimento, para romper os complexos protéicos, produzindo um extrato que contém quantidades apreciáveis de compostos interferentes (Hollman et al, 1993).

Os procedimentos de extração e hidrólise provavelmente constituem as mais importantes fontes de variação na determinação de vitaminas do complexo B, em alimentos, e a otimização destes procedimentos representará importante passo no melhoramento desses métodos (Hollman et al, 1993). A extração tradicional das vitaminas hidrossolúveis é feita com HCl diluído, em banho-maria por 30 min ou em autoclave a 121°C, por 15 minutos. Alguns trabalhos utilizam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído, em substituição ao HCl, como solvente extrator ou TCA diluído (Welhing & Wetzel, 1984).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Considerações gerais

O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Os grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] utilizados foram da variedade BRS-213 (livres de lipoxigenases L1, L2 e L3), safra 2007, doados pela EMBRAPA - Soja de Londrina - Paraná.

Os prebióticos utilizados foram oligofrutose (Raftilose P95) e inulina (Raftiline GR), doados pela EMBRAFARMA-Brasil e originários da ORAFTI-Bélgica. A glucose de milho marca “Karo” foi adquirida no comércio local.

Os probióticos foram originados do fermento lácteo Bio-Rich, constituído por culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e uma outra cultura não probiótica: *Streptococcus thermophilus*, de procedência dos laboratórios Christian Hansen, da Dinamarca, adquiridos no comércio local.

Os produtos lácteos para comparação com o “iogurte” de soja foram adquiridos no comércio local, estes foram: iogurte tradicional, bebida láctea e leite fermentado. O kefir foi obtido fermentando por 24 horas ,300 mL de leite de vaca e uma colher de sopa de kefir.

O trabalho foi dividido em duas etapas, constituídas por experimentos independentes. O experimento 1 consistiu em comparar seis tratamentos (T), os quais foram estabelecidos em:

**T0**=extrato de soja (ES), Controle 1;

**T1**=1 litro de ES, sem adição de prebióticos e fermentado com Bio-Rich, contendo probióticos (0,4g) (PRO), Controle 2;

**T2**=1 litro de ES, 142,4g de oligofrutose (O) e 44,3g de inulina (I) e fermentado com PRO;

**T3**=1 litro de ES, 71g de O e 22g de I e fermentado com PRO;

**T4**= 1 litro de ES, 35,5g de O e 11g de I e fermentado com PRO;

**T5**= 1 litro de ES, 80g de glucose de milho marca “Karo” (G) e fermentado com PRO.

As quantidades dos ingredientes foram baseadas nos trabalhos de Fuchs, (2005) e Haully (2005), que relataram que a máxima quantidade de prebióticos utilizada neste estudo resultou num “iogurte” de soja com características sensoriais de boa aceitabilidade, mas, Pak (2006), adverte sobre o uso de elevadas quantidades de prebióticos, portanto, foram pesquisadas também quantidades inferiores para comparação.

Foram realizadas análises físico-químicas e químicas do extrato e “iogurtes” de soja, imediatamente após a finalização da produção dos mesmos, sendo estas, pH, acidez titulavel, minerais, assim como composição centesimal do extrato e do grão de soja BRS-213. Verificou-se qual dos tratamentos estudados foi mais favorável para a produção da vitamina B<sub>12</sub>. Após a seleção do tratamento, determinou se a composição centesimal do mesmo, e foi realizada a segunda etapa do trabalho.

No experimento 1, a fermentação dos extratos de soja foi realizada por um período de 6 horas [tempo indicado pelos laboratórios de Bio-Rich e utilizado também por Fuchs (2005) e Haully (2005)] e foram analisadas posteriormente, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), tanto a vitamina B<sub>12</sub> como as isoflavonas.

No experimento 2, a fermentação do extrato de soja, cuja formulação apresentou maiores valores numéricos de vitamina B<sub>12</sub>, foi realizada nos tempos 0, 2, 3, 4 e 5 horas e, posteriormente, quantificou-se a vitamina B<sub>12</sub> por CLAE. Nesta etapa também se fez a quantificação por CLAE (em duplicata) da B<sub>12</sub> em diferentes produtos lácteos. Logo, os resultados de ambos os experimentos foram submetidos às análises estatísticas.

### **3.2 Extrato de soja e, processo fermentativo para obtenção do “iogurte” de soja**

O extrato de soja (“leite de soja”) foi preparado na proporção soja:água de 1:10 (100g/1000mL) (Nelson et al., 1997). As etapas para a obtenção do extrato de soja foram: seleção, limpeza e pesagem dos grãos, maceração (por 12 horas), eliminação da água de maceração, trituração dos grãos macerados com água destilada por 3’, processo térmico (98° C.10min), filtração com tecido de algodão, para obtenção do extrato e correção do volume final, conforme proporção soja: água de 1:10 (Smith & Circle, 1978; Lim et al., 1990 e Evans et al., 1997).

A produção do “iogurte” de soja procedeu conforme Bio-Rich (2007) (laboratórios Crhistian Hansen) e o tempo de fermentação de 6 horas coincidiu com vários trabalhos de “iogurte” de soja (Fuchs et al., 2005; Hauly., 2005). Em cada um dos cinco “iogurtes” estudados foi utilizado um litro de extrato de soja aquecido até 42°C, sem e com adição de prebióticos, sendo adicionado em todos a porção probiótica de 0,4g do fermento Bio-Rich aos 40°C (esta temperatura foi escolhida, tendo em conta a melhor temperatura para os três tipos de cultura de microrganismos utilizados), e misturados por 3 minutos.

Os substratos preparados foram colocados em tubos de ensaio estéreis com tampa e estes, levados à estufa com temperatura controlada de 40°C durante 6 horas. A fermentação foi finalizada, colocando os tubos de ensaio em água gelada a 5°C por 10 min., reservaram-se amostras para as análises físico-químicas e químicas e outra parte foi congelada.

### **3.3 Métodos de análises físico-químicas e químicas**

- **pH:** valores de pH no extrato e “iogurtes” de soja foram medidos imediatamente, ao finalizar sua preparação por médio de pHmetro, com inserção

do eletrodo diretamente no extrato e extratos de soja fermentados respectivamente.

- **Acidez titulável:** a acidez foi determinada imediatamente após a finalização do período de fermentação (6h), por titulação com solução de NaOH 0,1 N, conforme (AOAC, 1995) e expressa em % de ácido láctico, da mesma forma no extrato de soja.
- **Composição centesimal:** do grão, extrato de soja (leite de soja) e “iogurte” de soja: umidade, extrato etéreo do grão e do “iogurte”, proteína e cinzas foram realizados, segundo a metodologia de (AOAC, 1995), lipídeos do extrato de soja pelo método de Gerber (Pereira et al., 2001); a fibra bruta do grão de soja, conforme (Kamer & Ginkel, 1952) e extrato não nitrogenado (ENN) pelo método indireto por diferença.
- **Minerais:** do extrato de soja e nos “iogurtes” de soja: cálcio, ferro, sódio, potássio, magnésio e zinco foram analisados no Departamento de Química da UFLA, por espectrofotometria de absorção atômica, conforme (Sarruge et al., 1974).
- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:** as análises por CLAE foram realizadas para as isoflavonas nos laboratórios da EMBRAPA-Soja de Londrina-Paraná, e para a vitamina B<sub>12</sub>, nos laboratórios HIDROCEPE (Serviços de Qualidade Ltda., Belo Horizonte – MG).

A metodologia seguida para as análises de isoflavonas foi, conforme Carrão – Panizzi et al.( 2002), onde as amostras de extrato de soja e de “iogurtes” liofilizadas foram desengorduradas com n-hexano, à temperatura ambiente e 100mg de cada amostra desengordurada, foram transferidos para tubos de ensaio de 10 mL com tampa rosqueável. Em seguida, foram adicionados 4,0 mL de solução de etanol 70%, contendo 0,1% de ácido acético. Os tubos, contendo as amostras e a solução extratora, foram homogeneizados em agitador de tubos do tipo “Vortex” e submetidos à extração por uma hora em

temperatura ambiente. A cada intervalo de 15 minutos, os tubos eram agitados com o auxílio do agitador de tubos. 1,5 mL do extrato foram transferidos para tubos de microcentrífuga do “tipo Ependorff” e centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm, numa temperatura de 5°C. O sobrenadante foi filtrado através de membrana com poros de 0,45 µm, da marca “Millipore”. 20 µL do extrato filtrado foram utilizados para injeção no cromatógrafo líquido.

A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada por Berhow, 2002, em cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras.

Utilizou-se, para tanto, uma coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column), com 250mm de comprimento x 0,4mm de diâmetro interno e partículas de 5µm. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 60 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a corrida 25°C. Para a detecção das isoflavonas, foi utilizado o detector de arranjo de foto diodo da marca Waters, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda igual à 260 nm.

Para a identificação dos picos correspondentes à cada uma das isoflavonas foram utilizados padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína, da marca Sigma, solubilizados em metanol (grau HPLC), nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. Para a quantificação das 12 formas de isoflavonas, por padronização externa (área dos picos), foram utilizados os padrões como referência, bem como o coeficiente de extinção molar de cada uma delas, para o cálculo das outras formas (malonil e acetil).

A metodologia utilizada para as análises de vitamina B<sub>12</sub> foi segundo (Albalá-Hurtado et al., 1997), aplicada ao extrato e “iogurtes” de soja. O aparelho utilizado foi Varian equipado com bomba ternaria (Varian modelo 9010) e injetor automático (Varian modelo 9300). O detector utilizado no

sistema CLAE foi espectrofotométrico na região UV (Varian modelo 9050) com frequência de onda fixada em 361 nm. As amostras do extrato e extratos de soja fermentados foram injetadas numa coluna C18-Phenomenex 25 cm. Nº 4, com fluxo 1,5 mL/min.; o tempo de cada corrida foi de 20 minutos.

Os materiais utilizados foram: metanol grau HPLC (Vetec Química Fina Ltda.), ácido tricloroacético (TCA), ácido acético glacial (Cromoline<sup>R</sup> Química Fina Ltda.); trietilamina (Vetec Química Fina Ltda.); ácido octanosulfônico (Vetec Química Fina Ltda.) e água duplamente destilada (Milli-Q). Solução padrão de cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) de Sigma Aldrich e membrana de 0,45 µm (Millipore).

Fase Móvel: 5mM de ácido octanosulfônico, 0,5% de trietilamina, 2,4% de ácido acético glacial e 15% de metanol grau HPLC foram preparados, como segue: colocar 1,10g. de ácido octanosulfônico num recipiente (Becker) e adicionar 800ml de água duplamente destilada. Logo, adicionar 24mL de ácido acético glacial e 5ml de trietilamina na la solução aquosa. Misturar bem e ajustar o pH a 3,6±0,1 com ácido acético ou trietilamina. Adicionar 150mL de metanol grau HPLC, misturar completamente e transferir a um frasco volumétrico de 1 L. Completar o volume acima de 1 L. com água duplamente destilada. Filtrar a solução com uma membrana de 0,45 µm antes de injetar no sistema CLAE.

Para limpeza das amostras: a) Pesar dentro de um tubo de centrifuga (30 mm de diâmetro) 10,5g de amostra de “iogurte” de soja. Adicionar 1g de TCA sólido e agitar por 10 minutos, logo, centrifugar por 10 minutos (1250g) para obtenção de duas fases. Imediatamente adicionar 3 mL de TCA 4% ao resíduo sólido obtido, agitar por 10 minutos e centrifugar. Descartar a fase sólida. Misturar os dois extratos ácidos obtidos num balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com TCA 4%.

Os frascos, contendo amostras devem ser protegidos da luz com papel alumínio e o trabalho de laboratório deve ser realizado em penumbra. b) Os

extratos ácidos devem centrifugar-se uma vez mais antes de injetá-los no sistema CLAE. Para a identificação do pico correspondente à Vitamina B<sub>12</sub> foi utilizado padrão de B<sub>12</sub> da marca Sigma-Aldrich (12ppm), solubilizado em ácido acético aquoso 2,4% (v/v) e diluído em fase móvel. Para a quantificação da Vitamina B<sub>12</sub>, por padronização externa (área dos picos), foram utilizadas as áreas dos padrões como referência.

### 3.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental para as análises estatísticas foi de blocos casualizados com três repetições e 6 tratamentos caracterizados pelos diferentes substratos utilizados como base para a fermentação com probióticos para o experimento 1 e pelos diferentes tempos de fermentação para o experimento 2.

A diferença entre os 6 tratamentos consistiu em diferentes ingredientes adicionados ou não ao extrato de soja, incluindo diferentes proporções dos mesmos. Um mesmo dia, onde se prepararam todos os tratamentos com o mesmo extrato como base constitui um bloco.

As variáveis analisadas (teores de isoflavonas e vitamina B<sub>12</sub>) foram submetidas à análise de variância, utilizando os seguintes programas informáticos estatísticos: Sisvar (Ferreira, 2000) e R (R, 2004). Para as análises de isoflavona, os tratamentos foram organizados em contrastes mutuamente ortogonais (Gómes, 1982) para investigar a significância das diferenças observadas entre os grupos de interesse. Os cinco contrastes mutuamente ortogonais de interesse foram:

**Contraste 1:** Extrato de soja (ES) vs. "iogurtes" de soja:  
$$5(\bar{T}_0) - (\bar{T}_1 + \bar{T}_2 + \bar{T}_3 + \bar{T}_4 + \bar{T}_5).$$

**Contraste 2:** "iogurtes" de soja sem prebióticos vs. "iogurtes" de soja com adição de prebióticos:  $3(\bar{T}_1 + \bar{T}_5) - 2(\bar{T}_2 + \bar{T}_3 + \bar{T}_4).$

**Contraste 3** – entre “iogurtes” de soja sem prebióticos adicionados: “iogurtes” de soja sem glucose vs. “iogurte” de soja com glucose  $(\bar{T}_1) - (\bar{T}_5)$ .

**Contraste 4:** “iogurte” de soja com maior teor de prebióticos vs. “iogurtes” de soja com teores inferiores de prebióticos:  $2(\bar{T}_2) - (\bar{T}_3 + \bar{T}_4)$ .

**Contraste 5:** entre “iogurtes” de soja com tenores inferiores de prebióticos  $(\bar{T}_3) - (\bar{T}_4)$ .

A análise de variância para os resultados da vitamina B<sub>12</sub> do experimento 1 (6 h de fermentação) não detectou diferença significativa, também foi aplicado o teste de Tukey para estes resultados (Anexo 2A).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**4.1 Composição centesimal:** os resultados da composição centesimal do grão, extrato e “iogurte” de soja BRS-213 estão apresentados na Tabela 5.

**TABELA 5:** Composição centesimal do grão, extrato e “iogurte” de soja (BRS-213), e respectivos desvios padrão.

	Grãos de soja	Extrato de soja	“Iogurte” de soja
		%	
Umidade	9,9925	93,7125	86,1830
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,1480</b>	<b>0,0126</b>	<b>0,2535</b>
Lípidios	14,6035	1,8500	1,9825
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,8366</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0236</b>
Proteína	32,5175	3,3500	3,4750
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,8014</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,1258</b>
Fibra bruta	6,7025	-	-
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,6357</b>	-	-
Cinzas	4,5575	0,2900	0,2000
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,1218</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
ENN	31,6265	0,7975	8,1595
<b>Desvio padrão</b>	<b>1,8615</b>	<b>0,0126</b>	<b>0,1335</b>

Conforme Tabela 5, o teor de umidade do grão de soja apresentou-se da ordem de 9,99%, sendo a matéria seca da ordem de 90,01 podendo constatar-se baixo teor de lipídeos, com relação a outras variedades de soja cultivadas no Brasil, cuja faixa de valores para a porção lipídica mostrou-se entre 14,7 e 28,4% (Castro et al., 1973). A soja deste estudo foi uma variedade não convencional (livre de lipoxigenase).

A composição centesimal do extrato e do “iogurte” de soja apresentou variação apenas para os teores de umidade e extrato não nitrogenado, pois o que variou nessas matrizes alimentares foi a adição de prebióticos (carboidratos) no caso do “iogurte”, e, como os prebióticos são muito higroscópicos, absorvem

umidade, diminuindo o teor de umidade no “iogurte”, em relação ao extrato e aumentando o ENN, pelo aumento de carboidratos no “iogurte”. Os teores de lipídeos e proteínas no “iogurte” de soja, coincidiram com os teores obtidos por Fuchs et al., (2005) e Haully, (2005).

Os resultados encontrados neste trabalho, para a composição centesimal do grão e extrato de soja BRS-213 (Tabela 9) foram semelhantes aos resultados de Ciabotti (2004), encontrando para os grãos de soja: 9,28% de umidade, 33,29% de proteína, 15,30% de lipídeos, 7,09% de fibra, 3,843% de cinzas e 31,19% de ENN e; para o extrato de soja, os seguintes valores: umidade=93,79%, lipídeos =1,72%, proteína=3,26%, cinzas=0,36% e ENN=0,87%.

Os dados registrados pela EMBRAPA-Soja para a composição centesimal do grão de soja BRS-213 (safra 2007) foram os seguintes: umidade=5,81%, proteína=37,31%, lipídeos=18,74%, cinzas=4,16%, ENN=33,98%, os quais aproximam-se também os resultados apresentados na Tabela 9.

**4.2 pH e acidez titulável :** os valores médios de pH e de acidez titulável do extrato e “iogurtes” de soja são apresentados na Tabela 6.

**TABELA 6:** Valores médios de pH e acidez titulável do extrato e “iogurtes” de soja e respectivos desvios padrão.

Tratamentos	pH	Acidez titulável (% ácido láctico)
T0	6,9400	0,0927
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,0458</b>	<b>0,0004</b>
T1	4,5190	0,3767
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,1002</b>	<b>0,0633</b>
T2	4,4927	0,3583
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,0812</b>	<b>0,0275</b>
T3	4,4087	0,3807
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,0895</b>	<b>0,0692</b>
T4	4,4867	0,3723
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,1415</b>	<b>0,0630</b>
T5	4,4500	0,3727
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,0656</b>	<b>0,0635</b>

**T0**=extrato de soja (ES) ; **T1**=1 litro de ES, sem adição de prebióticos (PRE) ou glucose de milho (G) e fermentado com 0,4g de fermento Bio-Rich, contendo probióticos (PRO); **T2**=1 litro de ES, 142,4g de Oligofrutose e 44,3g de Inulina e fermentado com PRO; **T3**=1 litro de ES, 71g de O e 22g de I e fermentado com PRO; **T4**= 1 litro de ES, 35,5g de O e 11g de I e fermentado com PRO; **T5**= 1 litro de ES, 80g de G e fermentado com PRO.

Conforme a Tabela 6, a fermentação do extrato de soja por 6 horas proporcionou valores médios de pH entre 4,41 (T3) e 4,52 (T1) indicando liberação de ácidos por bactérias fermentativas. O pH considerado ótimo para formação de gel no extrato de soja para produção de “iogurte” é de 4,5-4,6, sendo que a composição deste substrato torna o processo de coagulação mais lento, em relação ao iogurte de leite de vaca (Chumchuere, et al., 1999). O pH típico do extrato de soja não fermentado (leite de soja), citado na literatura aproxima-se de 7 (Mondragón & Maugeri, 2004), valor semelhante ao deste estudo.

Os valores de pH verificados nos “iogurtes” de soja (Tabela 7) se aproximam favoravelmente ao pH considerado melhor para formação de gel, mas já atinge uma faixa que não é considerada ideal para a velocidade de

crescimento das Bifidobactérias, porém, ainda não representa uma condição de risco extremo para a sobrevivência das mesmas.

Segundo Lourens-Hauttting et al. (2001), a faixa ótima de sobrevivência de espécies de Bifidobactérias situa-se entre o pH 5,5 e 5,6, o crescimento das mesmas retarda, a partir de pH 5,0 e, acontece inibição em pH da ordem de 3,6. Em condições extremas de pH, entre 1,5 e 3,0, espécies de *B. Longum* e *B. pseudolongum* sobrevivem melhor que *B. bifidus*.

Parâmetros de pH e acidez titulável são considerados eixos na formulação de iogurtes de leite de vaca. Como os “iogurtes” de soja ainda não se encontram disponíveis em todos os mercados. Esses parâmetros estão sendo estudados e variam tanto de uma formulação para outra como ao se comparar com os iogurtes produzidos a partir do leite de vaca.

Em geral, a baixa acidez das bebidas lácteas fermentadas favorece sua aceitabilidade pelos consumidores. Além disso, a produção de ácido lático, substância característica de todos os leites fermentados, age como conservante natural, além de tornarem-se mais digeríveis os componentes dos substratos, favorecendo aos indivíduos aclorídricos, isto é, com carência de suco gástrico (Silva et al., 2001).

Deste ponto de vista, a acidez atingida tanto pelo extrato de soja quanto pelos “iogurtes” de soja (Tabela 6) é considerada baixa em comparação aos valores de acidez atingidos pelos “iogurtes” de leite de vaca, que geralmente variam em torno de 0,70-0,72% de ácido lático, fato que afeta positivamente o sabor do produto obtido (Tamine & Robinson, 1985).

#### **4.3 Minerais**

Os resultados obtidos em relação à presença dos minerais: cálcio, ferro, sódio, potássio, magnésio e zinco no extrato e “iogurtes” de soja são apresentados na Tabela 7.

**TABELA 7** Teores médios de minerais para o extrato de soja e “iogurtes” de soja e respectivos desvios padrão.

<b>Minerais</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
Cálcio (%)	0,03	0,02	0,06	0,07	0,05	0,05
<b>Desvio padrão</b>	0,0071	0,0000	0,0000	0,0141	0,0000	0,0000
Ferro (ppm)	10,75	14,1	11,1	9,35	11,1	11,1
<b>Desvio padrão</b>	0,6364	14,1421	2,9698	0,6364	0,2828	1,4142
Sódio (%)	2,92	20,22	20,24	22,27	18,06	20,24
<b>Desvio padrão</b>	0,4243	0,0000	1,8385	12,7279	5,1619	0,7778
Potássio (%)	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
<b>Desvio padrão</b>	0,0071	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Magnésio (%)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Desvio padrão</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Zinco (ppm)	4,3	5,0	4,1	4,2	4,1	4,1
<b>Desvio padrão</b>	0,7778	0,9899	0,2828	0,0707	0,1414	0,1414

**T0**=extrato de soja (ES) ; **T1**=1 litro de ES, sem adição de prebióticos (PRE) ou glicose de milho (G) e fermentado com 0,4 de fermento Bio-Rich, contendo prebióticos (PRO); **T2**=1 litro de ES, 142,4g de Oligofrutose e 44,3g de Inulina e fermentado com PRO; **T3**=1 litro de ES, 71g de O e 22g de I e fermentado com PRO; **T4**= 1 litro de ES, 35,5g de O e 11g de I e fermentado com PRO; **T5**= 1 litro de ES, 80g de G e fermentado com PRO.

Conforme Tabela 7, os teores de cálcio, potássio, magnésio e zinco quase não variaram na comparação do extrato de soja com os “iogurtes” de soja, porém os teores de ferro e sódio aumentaram nos “iogurtes”. É importante observar que os ingredientes adicionados ao extrato de soja (prebióticos e glucose de milho), visando a fermentação, são de origem vegetal e, provavelmente, contém algum teor desses citados minerais, o que pode ter propiciado a elevação de ambos minerais no produto final.

O “iogurte” de soja mostrou teor médio de cálcio da ordem de 50mg.100g<sup>-1</sup>. Este valor mostra-se inferior ao teor de cálcio do iogurte convencional (iogurte de leite de vaca) com 103mg.100g<sup>-1</sup>, conforme Haully et al. (2005), mas, está demonstrado que a suplementação de fermentados com

oligofrutose e inulina favorece a absorção intestinal deste mineral, ou seja, aumenta sua biodisponibilidade, assim como incrementa sua concentração e melhora a estrutura dos ossos (Pak, 2006). Também, está demonstrado que no metabolismo da soja se elimina menor quantidade de cálcio pela urina, então, a quantidade que fica no organismo é maior.

O teor de ferro do “iogurte” de soja é maior (1,07mg/100g) (Tabela 7) que o do iogurte de leite de vaca (0,05mg/100g) (Fuchs et al., 2005). O teor de sódio do “iogurte” de soja é bem menor que em queijos, iogurtes e leites de vaca (46mg/100g) (Haully et al., 2005), o que também favorece à saúde (Fuchs et al., 2005).

A porcentagem de potássio, de zinco e de magnésio é baixa, mas, como os minerais são micro-nutrientes, pequenas quantidades presentes são igualmente importantes, tendo em conta que devido ao adubo químico da agricultura atual, a disponibilidade dos mesmos nos alimentos tem diminuído acentuadamente (La Justicia Bergasa, 1986).

#### **4.4 Teores de isoflavonas e de vitamina B<sub>12</sub> no “iogurte” de soja**

**Isoflavonas:** Os teores de isoflavonas no grão, extrato e “iogurtes” de soja BRS-213, são apresentados na Tabela 8.

**TABELA 8** Teores médios de isoflavonas do grão, extrato e “iogurtes” de soja.

Isoflavonas	Teor de isoflavonas (mg.100g <sup>-1</sup> )						
	Grão de soja	T0	T1	T2	T3	T4	T5
<i>Glicosídeos conjugados</i>							
<i>Malonil- Glicitina</i>	20,53	31,67	25,02	5,91	10,66	8,69	13,21
<i>Malonil- Genistina</i>	122,56	116,98	91,96	22,15	36,89	33,44	45,11
<i>Malonil-Daidzina</i>	66,05	107,46	70,39	17,50	34,45	24,83	35,30
<i>Glicosil- Glicitina</i>	12,81	10,62	8,97	4,25	6,11	2,75	9,14
<i>Glicosil- Genistina</i>	52,32	46,18	48,09	10,74	18,12	15,49	21,68
<i>Glicosil- Daidzina</i>	53,07	37,08	37,04	8,48	15,40	11,48	16,23
<i>Agliconas</i>							
<i>Gliciteína</i>	5,59	11,11	8,08	1,77	2,56	2,72	4,52
<i>Genisteína</i>	37,40	34,60	38,41	8,02	13,71	12,96	18,61
<i>Daidzeína</i>	25,81	16,55	19,60	3,92	6,70	6,34	9,23
<b>Total</b>	<b>396,14</b>	<b>412,25</b>	<b>347,56</b>	<b>82,74</b>	<b>144,6</b>	<b>118,7</b>	<b>173,03</b>

**T0**=extrato de soja (ES); **T1**=1 litro de ES, sem adição de prebióticos (PRE) ou glucose de milho (G) e fermentado com 0,4g de fermento Bio-Rich, contendo probióticos (PRO); **T2**=1 litro de ES, 142,4g de Oligofrutose (O) e 44,3g de Inulina (I) e fermentado com PRO; **T3**=1 litro de ES, 71g de O y 22g de I e fermentado com PRO; **T4**= 1 litro de ES, 35,5g de O e 11g de I e fermentado com PRO; **T5**= 1 litro de ES, 80g de G e fermentado com PRO.

Conforme Tabela 8, embora tenham sido apresentados apenas nove tipos de isoflavonas, tanto para o grão de soja, para o extrato de soja quanto para os “iogurtes de soja” em estudo, foram analisadas doze tipos de isoflavonas no total, sendo nove glicosídeos conjugados e três agliconas, porém não foram detectados valores para a acetil-glicitina, acetil-genistina e acetil-daidzina neste estudo. Para as análises estatísticas foram utilizados os resultados totais de isoflavonas.

Os glicosídeos incluem, conforme Tabela 8, três formas “malonil” (glicitina, genistina e daidzina); três formas “glicosil” (glicitina, genistina e

daidzina) e, três formas agliconas (gliciteína, genisteína e daidzeína) - estas últimas são as formas mais desejáveis nos alimentos.

Para os grãos de soja (Tabela 8), os valores de isoflavonas na forma “malonil”, variaram entre 20,53 (malonil glicitina) e 122,56mg de isoflavonas/100g (malonil genistina). E na forma “glicosil”, variaram entre 12,81 (glicosil glicitina) e 53,07mg de isoflavonas (glicosil daidzina) por 100g. Os valores de isoflavonas nas formas “agliconas” variaram entre 5,59 (gliciteína) e 37,40mg de isoflavonas (genisteína) por 100g.

Para o extrato de soja (leite de soja) não fermentado (Tabela 8), os valores de isoflavonas na forma “malonil”, variaram entre 31,67 (malonil glicitina) e 107,46 mg de isoflavonas (malonil daidzina) por 100g. E na forma “glicosil”, variaram entre 10,62 (glicosil glicitina) e 46,18 mg de isoflavonas por 100g (glicosil genistina). Para as formas “agliconas” variaram entre 11,11 (gliciteína) e 34,60 mg de isoflavonas por 100g (genisteína).

Para os “iogurtes” de soja, os valores de isoflavonas na forma “malonil”, variaram entre 5,91mg (malonil glicitina) para o Tratamento 2 [1 litro de ES, 142,4g de oligofrutose (O) e 44,3g de inulina (I) e fermentado com PRO] e 91,06 mg de isoflavonas (malonil genistina) por 100g do “iogurte” de soja para o Tratamento 1 [1 litro de ES, fermentado com 0,4g de fermento Bio-Rich, contendo probióticos (PRO)]. E para as formas “glicosil”, variaram entre 2,75mg (glicosil glicitina) para o Tratamento 4 [1 litro de ES, 35,5g de O e 11g de I e fermentado com PRO] e 48,09 mg de isoflavonas por 100g de “iogurte” de soja (glicosil genistina) para o Tratamento 1 descrito acima. Para as formas “agliconas”, variaram entre 1,77mg (gliciteína) para o Tratamento 2 descrito acima e 38,41 mg de isoflavonas/100g de “iogurte” de soja (genisteína).

Nos três casos do estudo (grão, extrato e “iogurtes” de soja) os menores valores de isoflavonas agliconas, formas mais desejáveis nos alimentos, porque aumentam a biodisponibilidade de equol e têm maior atividade antioxidante,

corresponderam aos tipos gliciteína e, por sua vez, os maiores valores corresponderam à genisteína.

Conforme Tabela 8, os componentes das isoflavonas para o grão de soja BRS-213 (safra 2007) são os mesmos que para o extrato de soja e “iogurtes” de soja, mas o valor total é inferior ao do extrato de soja. Isto é esperado, posto que, com o tratamento térmico, ao qual é submetido o extrato (com o resíduo incluído antes da filtração), as isoflavonas contidas no grão são liberadas e seu teor aumenta. Segundo Ciabotti (2004), o grão de soja BRS-213 apresentou total de valores médios de isoflavonas igual a 220,21 mg.100g<sup>-1</sup>. O presente estudo apresentou valores maiores aos de Ciabotti, mas como já foi dito, esses valores variam mesmo de uma safra para outra.

A comparação por meio de contrastes, dos teores médios de isoflavonas do extrato de soja e dos “iogurtes” de soja é apresentada na Tabela 9.

**TABELA 9** Comparação, por meio de contrastes, dos teores médios de isoflavonas do extrato e “iogurtes” de soja.

Contraste	Descrição do contraste (T) = (teor médio de isoflavonas de cada tratamento)	Estimativa do contraste	p-valor
1	ES vs. “iogurtes”: $5(\bar{T}_0) - (\bar{T}_1 + \bar{T}_2 + \bar{T}_3 + \bar{T}_4 + \bar{T}_5)$	238,34	0,000
2	“Iogurtes” sem PRE vs. “iogurtes” com adição de PRE $3(\bar{T}_1 + \bar{T}_5) - 2(\bar{T}_2 + \bar{T}_3 + \bar{T}_4)$	145,63	0,000
3	Entre os “iogurtes” sem PRE adicionados: sem G vs. com G $(\bar{T}_1) - (\bar{T}_5)$	172,55	0,000
4	“Iogurte” com maior quantidade de PRE vs. “iogurtes” com quantidades inferiores de PRE $2(\bar{T}_2) - (\bar{T}_3 + \bar{T}_4)$	-49,41	0,034
5	Entre “iogurtes” com quantidades inferiores de PRE: $(\bar{T}_3) - (\bar{T}_4)$	26,89	0,281

**T0**=extrato de soja (ES); **T1**=1 litro de ES, sem adição de prebióticos (PRE) ou glucose de milho (G) e fermentado com 0,4g de fermento Bio-Rich, contendo probióticos (PRO); **T2**=1 litro de ES, 142,4g de oligofrutose (O) e 44,3g de inulina (I) e fermentado com PRO; **T3**=1 litro de ES, 71g de O y 22g de I e fermentado com PRO; **T4**= 1 litro de ES, 35,5g de O e 11g de I e fermentado com PRO; **T5**= 1 litro de ES, 80g de G e fermentado com PRO.

De acordo com o teste F, de análise de variância, foram detectadas diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os teores médios de isoflavonas nos tratamentos estudados. Em seguida, de acordo com o teste t, foram considerados significativos os contrastes 1, 2, 3 e 4, a saber:

Pelo contraste 1 observa-se que o extrato de soja (T0) apresentou teor médio de isoflavonas maior que a média dos “iogurtes” (T1, T2, T3, T4 e T5) de 238,3 mg.100g<sup>-1</sup> (p=0, 000).

Observando-se o contraste 2, os “iogurtes” sem prebióticos adicionados (T1 e T5) apresentaram, em média, teor de isoflavonas maior que o teor de isoflavonas médio apresentado pelos “iogurtes” com prebióticos adicionados (T2, T3 e T4) 145,6 mg/100g (p=0, 000).

O contraste 3 mostra que o “iogurte” sem adição de prebióticos e sem adição de glucose (T1) apresentou teor de isoflavonas maior que o “iogurte” com adição de glucose (T5) de 172,6 mg/100g (p=0, 000).

Pelo contraste 4, foi mostrado que o “iogurte” com maior teor de prebióticos apresentou teor médio de isoflavonas menor que a media dos “iogurtes” com teores inferiores de prebióticos com o valor de -49,4 mg/100g (p=0, 034).

O contraste 5 mostra que os teores de isoflavonas encontrados nos “iogurtes” com teores de prebióticos inferiores à quantidade máxima utilizada são estatisticamente iguais (p=0, 281).

Quanto à presença de isoflavonas, observa-se um padrão de comportamento, segundo o tipo de tratamento. Os tratamentos sem ingredientes adicionados apresentam maior teor de isoflavonas, talvez, porque a presença de ingredientes favorece certas transformações que acontecem durante a fermentação. O extrato de soja apresentou teor médio de isoflavonas muito superior aos “iogurtes” estudados, o que indica que a fermentação acarreta diminuição de isoflavonas durante o processo, porém como é sabido que as bactérias hidrolisam isoflavonas, transformando-as em equol (isoflavona biodisponível para absorção dentro do intestino), forma pela qual são absorvidos, talvez os compostos quantificados fossem transformados em equol no próprio alimento e, dessa maneira, chegariam ao intestino disponível para sua

absorção, então, não sealaria de “diminuição” propriamente dita, senão de “transformação”. Essa suposição poderá ser esclarecida em estudos posteriores, pois o equol não foi analisado neste estudo.

Entre os “iogurtes”, também aquele que não teve ingredientes adicionados apresentou média de isoflavonas maior. Os “iogurtes” com prebióticos: oligofrutose e inulina, em diferentes proporções, apresentaram entre eles diversos teores de isoflavonas, porém aquele com maior quantidade de prebióticos apresentou a menor média de isoflavonas, indicando que quantidades elevadas de prebióticos acarretam maior diminuição que quantidades moderadas.

Entre os “iogurtes” com teores inferiores de prebióticos o teor médio de isoflavonas é semelhante não se verificando diferença significativa entre eles. O “iogurte” com glucose de milho apresentou menor média de isoflavonas que o “iogurte” sem ingredientes adicionados, porém maior média que os “iogurtes” com prebióticos, o que indica que dos ingredientes adicionados, os prebióticos acarretam maior diminuição que a glucose de milho.

No processo de fermentação as isoflavonas analisadas diminuem, porém ainda permanecem no “iogurte”, em quantidades significativas, o que não acontece com outros subprodutos de soja como o tofu (queijo de soja), onde as isoflavonas vão para o soro (Ciabotti, 2004) ou como no caso da daidzina e genistina, que por serem compostos lipófilos são removidos pela extração alcoólica nos subprodutos da soja (Park, 2001).

### **Vitamina B<sub>12</sub>**

Na Tabela 10 seguem os valores médios em  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de vitamina B<sub>12</sub> encontrados nos “iogurtes” de soja analisados por CLAE.

**TABELA 10** Valores médios da vitamina B<sub>12</sub> nos “iogurtes” de soja fermentados por 6 horas. Experimento 1.

Tratamento	Descrição	Vitamina B <sub>12</sub> (µg/100g)
T1	Extrato de soja + probióticos	74,16
T2	Extrato de soja+142,4g/L de oligofructose + 44,3g/L de inulina + probióticos	73,75
T3	Extrato de soja + 71g/L de oligofructose + 22g/L de inulina + probióticos	85,01
T4	Extrato de soja + 35,5g/L de oligofructose + 11g/L de inulina + probióticos	85,66
T5	Extrato de soja + 80g/L de glicose de milho “Karo” + probióticos	85,26

A análise de variância para os teores de vitamina B<sub>12</sub> encontrados no experimento 1 (Tabela 10) não detectou diferença significativa entre os tratamentos estudados (p-valor = 0,86). Isso indica que qualquer dos substratos utilizados como base para o processo fermentativo é adequado para a produção de “iogurte” de soja.

O tratamento 4 apresentou maior quantidade numérica de B<sub>12</sub>, isto, unido a vantagem comprovada de adicionar prebióticos ao “iogurte”, para assegurar a viabilidade dos probióticos durante sua vida de prateleira e dentro do intestino, uma vez ingeridos (Haully, 2005; Pak, 2006) e por representar uma quantidade moderada de prebióticos (requisito para evitar desconforto intestinal) foram as razões da escolha do tratamento 4, para prosseguir com o experimento 2.

A glucose de milho não é prebiótico, porque é digerível pelo ser humano, mas, também constitui substrato de probióticos no alimento e as bactérias a utilizam mais rapidamente que à oligofructose ou à inulina, porque a glucose já está disponível, não é necessário hidrolisá-la para uso. A glucose de milho outorga ao “iogurte” sabor agradável e é uma matéria prima econômica,

que poderia ser utilizada também para a produção, mas sem as vantagens dos prebióticos, pois não assegura a viabilidade dos probióticos durante a vida de prateleira (as bactérias a consomem rapidamente), nem dentro do intestino (porque o ser humano o absorve).

É sabido que não existem alimentos de origem vegetal, que sejam fontes confiáveis de vitamina B<sub>12</sub>, só alguns fermentados da soja como o tempeh (0,047-3,9 µg/100g de tempeh fresco) (Shurtleff & Aoyagi, 1979), misso, shoyu apresentam a vitamina, porém em quantidades desprezíveis .

As algas constituem outra fonte, mas estas, como dito anteriormente, apresentam formas “análogas” à vitamina B<sub>12</sub>, portanto, sem valor para o ser humano e sem constituir uma fonte confiável desta vitamina (Slywitch, 2006).

Apesar da Ingestão Dietética Recomendada (RDA) ser mínima (0,28µg.dia<sup>-1</sup>), as fontes de origem vegetal conhecidas até agora não são confiáveis, portanto, a elevada quantidade de vitamina B<sub>12</sub> produzida pelas bactérias probióticas utilizadas neste estudo, pode ser considerado um fato interessante, pois o “iogurte” de soja se tornaria, neste caso, o primeiro alimento fermentado de origem vegetal que fornece quantidades significativas desta vitamina.

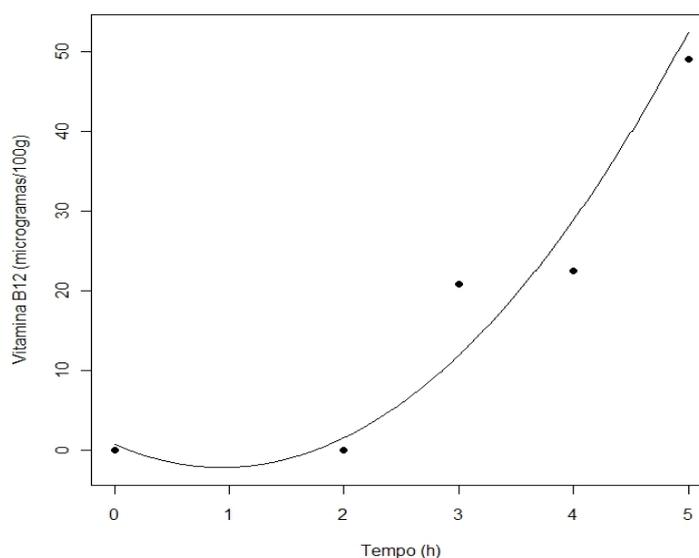
Faltariam estudos para desenvolver formulações válidas para produção industrial do “iogurte” de soja, que preencham as exigências sensoriais e de aceitabilidade por parte do consumidor, mas que ao mesmo tempo, mantenham as características funcionais desejadas (viabilidade dos probióticos, manutenção das qualidades do produto durante a vida de prateleira, preservação da vitamina B<sub>12</sub> entre outras, etc.).

#### 4.5 Vitamina B<sub>12</sub> no “iogurte” de soja em diversos tempos de fermentação (experimento 2)

A análise de variância para os teores de vitamina B<sub>12</sub> encontrados no experimento 2 detectou diferença significativa entre os tempos de fermentação (p-valor < 0,05).

Na Figura 6 está apresentado o modelo de regressão ajustado após a análise de variância para explicar o comportamento da vitamina B<sub>12</sub> ao longo do tempo de fermentação (em horas).

O tempo de fermentação de 6 horas não foi incluído, porque corresponde a outro experimento (experimento 1), mas a correlação é a que se esperaria na continuidade lógica do gráfico (85 µg.100<sup>-1</sup>).



**FIGURA 6** Modelo de regressão, segundo equação quadrática (parábola), para resultados de vitamina B<sub>12</sub>, em diferentes tempos de fermentação – (experimento 2).

No experimento 2 (Figura 6), os tempos estudados não permitiram observar qual o ponto da curva, onde a produção da vitamina B<sub>12</sub> se estabiliza. É possível supor que isto acontecerá, porque o pH diminui com o tempo de fermentação (Tabela 11) e atingirá um ponto no qual causará inibição do crescimento das bactérias e, provavelmente, logo estas começarão a morrer, mas a vitamina B<sub>12</sub> permanece no “iogurte”. Experimentos posteriores poderão esclarecer esta suposição.

Na Tabela 11 apresentam-se os valores médios de pH dos “iogurtes” de soja em diferentes tempos de fermentação, onde verifica-se que o pH diminui ao longo dos tempos de fermentação.

**TABELA 11:** Valores médios de pH dos extratos de soja em diversos tempos de Fermentação

Tempos de fermentação	Amostras				
	T1	T2	T3	T4	T5
	pH				
0 h	6,85	6,94	6,88	6,9	6,86
2 h	5,32	5,31	5,44	5,41	5,40
3 h	4,91	4,85	4,88	4,92	4,90
4 h	4,77	4,74	4,69	4,65	4,70
5 h	4,65	4,62	4,59	4,60	4,58

**T1**=1 litro de ES, sem adição de prebióticos (PRE) ou glucose de milho (G) e fermentado com 0,4g de fermento Bio-Rich, contendo probióticos (PRO); **T2**=1 litro de ES, 142,4g de oligofrutose (O) e 44,3g de inulina (I) e fermentado com PRO; **T3**=1 litro de ES, 71g de O y 22g de I e fermentado com PRO; **T4**= 1 litro de ES, 35,5g de O e 11g de I e fermentado com PRO; **T5**= 1 litro de ES, 80g de G e fermentado com PRO.

Os trabalhos de Wang et al., (1994); Hou et al., (2000), Farnworth et al., (2006); apresentam ótimo crescimento das culturas probióticas em “iogurte” de

soja e aumento do teor de vitaminas hidrossolúveis no caso de Hou et al., mas, nestes trabalhos a vitamina B<sub>12</sub> não foi pesquisada.

Apesar de existirem muitos trabalhos na literatura sobre “iogurte” de soja, podendo citar alguns deles (Haully, 2005; Fuchs et al, 2005; Umbelino et al., 2001; Kamaly, 1997; Mondragón & Maugeri, 2004; Chumchuere & Robinson, 1999; Wang et al.; 2006), abordando não só os parâmetros relacionados à produção do “iogurte” e à adição de prebióticos, senão, também, todo o referente à cinética e múltiplos aspectos que incluem às Bifidobactérias e outras bactérias probióticas, porém não foram encontradas referências sobre a vitamina B<sub>12</sub> no “iogurte” de soja, o que limita a discussão.

Porém, existem antecedentes, afirmando que a incorporação da Bifidobactéria dentro da cadeia de alimentos pode ser difícil, porque, usualmente, esta exibe um crescimento fraco em leite de vaca e requer um ambiente anaeróbico (Rasic, 1990), baixo potencial de óxido-redução e adição de fatores bifidogênicos (prebióticos), para obter os níveis de crescimento desejados, assim como o “flavor” característico do ácido acético que não favorece às qualidades sensoriais (Klaver et al., 1993).

Rasic & Kurmann, (1993) e Gomes et al. (1998), também afirmam que apesar de o leite de vaca ser o meio de cultivo preferencial para o crescimento das Bifidobactérias, é bem conhecido o fraco poder de propagação destas espécies naquela matriz. Apesar de ser um alimento altamente nutritivo, o leite de vaca não possui aminoácidos livres nem peptídeos, em concentrações suficientes, para permitir o crescimento destes microorganismos.

Segundo Tamine et al., (1995), as Bifidobacterias crescem em medios que contem fitona (peptona de soja) e prebióticos em forma natural, como a soja. Segundo Shimakawa et al., (2003) o extrato de soja é um exelente veículo para Bifidobactérias, já que sua proteína protege ao microorganismo da ação de sais biliares, favorecendo a colonização intestinal; estes dados apontam à soja (neste

caso, ao extrato de soja) como medio eficaz para estimular o crescimento das Bifidobactérias, melhor que o leite de vaca, por tanto, a ideia de produção industrial de “iogurte” de soja é positiva e viavel.

#### 4.6 Comparação dos teores de vitamina B<sub>12</sub> em “iogurte” de soja e productos lácteos analisados.

Na Tabela 12 são comparados teores de vitamina B<sub>12</sub> encontrados no “iogurte” de soja deste estudo, em alguns productos lácteos adquiridos no comercio local, e productos lácteos segundo Combs (2002).

**TABELA 12** Teores de vitamina B<sub>12</sub> no “iogurte” de soja, em alguns productos lácteos adquiridos no comercio de Lavras – MG e analisados neste estudo e, productos lácteos conforme Combs (2002).

Produtos	Vitamina B <sub>12</sub> (µg.100g <sup>-1</sup> )
“Iogurte” de soja <sup>x</sup>	73,75-85,66
Iogurte <sup>x</sup>	0
Kefir <sup>x</sup>	24,5
Bebida Láctea <sup>x</sup>	0
Leite fermentado <sup>x</sup>	0
Leite <sup>z</sup>	0,36
Queijo <sup>z</sup>	0,36-1,71
Iogurte <sup>z</sup>	0,06-0,62

x= Analisados neste estudo; z= Combs (2002)

Conforme Tabela 12 o kefir foi o único produto lácteo analisado neste estudo que apresentou teor de vitamina B<sub>12</sub> na sua composição.

O kefir é obtido pela incubação de grãos de kefir em leite de vaca ou água com açúcar, sendo fermentado com índice baixo de álcool. Os grãos de kefir se apresentam como massas brancas ou levemente amareladas, gelatinosas, compostas de proteína e de polissacarídeos, os quais contém bactérias e

leveduras envolvidas na fermentação, sendo recuperados e reutilizados para próxima incubação (Gabrich; Soares, 2007) citado em Campos, 2008, e a vitamina B<sub>12</sub> é produzida pelas bactérias do género *Lactobacillus*, que fazem parte da sua composição (Garrote et al., citado em Pereira, 2007).

O kéfir foi o único produto lácteo analisado neste estudo que teve produção caseira. Os outros productos lácteos analisados foram adquiridos no comercio local e em teoria deveriam apresentar teor de vitamina B<sub>12</sub>, mas, nas análises por CLAE não foram detectadas quantidades dessa vitamina.

Fatores que se apresentam nos procesos de produção industrial tais como: pasteurização, refrigeração, transporte e armazenamento (vida de prateleira prolongada), poderiam influenciar tal vez na presença ou degradação de alguns micronutrientes a exemplo das vitaminas, mas, isto não foi comprovado.

## 5 CONCLUSÕES

A vitamina B<sub>12</sub> é verificada em quantidades elevadas no iogurte de soja, fermentado por seis horas, independentemente dos tipos de ingredientes adicionados, que não interferem na produção da mesma.

A partir de três horas de fermentação, as quantidades de vitamina B<sub>12</sub> foram aumentando até 5 horas de fermentação.

O processo fermentativo do extrato de soja produz diminuição das isoflavonas analisadas.

A adição de ingredientes, prebióticos ou glucose de milho, na obtenção do iogurte, induz à diminuição das isoflavonas analisadas; os prebióticos de maneira mais acentuada que a glucose.

As composições centesimais do extrato e “iogurte” de soja BRS-213, assim como os valores médios de pH e acidez dos mesmos encontram-se na faixa de valores aceitáveis e favoráveis à produção de “iogurte” de soja.

## POSSIBILIDADES E FUTURAS PESQUISAS

As possibilidades que se abrem para a ciência, a partir deste trabalho são muito interessantes, pois, o passo seguinte na pesquisa poderia ser esclarecer se as bactérias que produzem a vitamina B<sub>12</sub> no alimento podem produzi-la também no intestino, se este fosse recolonizado por elas, o qual é possível e desejável visto todos os benefícios para a saúde que as ditas bactérias acarretam.

Além do mais, não são conhecidos efeitos colaterais por excesso de vitamina B<sub>12</sub> e se esta fosse produzida em grandes quantidades, a partir da microbiota intestinal, poderia ser absorvida, talvez, por difusão passiva como explicado no referencial teórico, que é o mecanismo que se ativa quando grandes quantidades de B<sub>12</sub> se encontram no intestino. Os Lactobacilos e Bifidobactérias podem colonizar o intestino delgado, não se restringindo ao intestino grosso, seria interessante pesquisar qual o comportamento destas bactérias ao colonizar o intestino em pesquisas futuras.

Também chama a atenção o fato de que animais produzem a vitamina B<sub>12</sub> a partir da sua microbiota intestinal. Por que isto é diferente no ser humano?. Não são as Bifidobactérias uma das principais integrantes da microbiota intestinal do ser humano recém-nascido e logo vão sendo eliminadas ou diminuem significativamente com a idade?. Porque e como são eliminadas estas bactérias benéficas que ajudam na prevenção de doenças e eliminam bactérias patogênicas?

Sem dúvida, os resultados deste estudo podem guardar relação com a linha de pesquisa desenvolvida pelas novas áreas da Medicina já citadas (a metabolômica e a metabologia), as quais, entre outros temas, colocam ênfases no rol das bacterias, na preservação da saúde humana e na possibilidade de modular conscientemente a microbiota intestinal a favor de uma população bacteriana benéfica.

Seria adequado pesquisar a produção da vitamina B<sub>12</sub> por parte das bactérias probióticas utilizadas neste estudo, sem a ação dos *Streptococcus thermophilus*, os quais aceleram o processo fermentativo. Tal vez numa fermentação mais demorada a produção de vitamina B<sub>12</sub> seja favorecida.

Em relação aos resultados obtidos sobre o comportamento dos componentes das isoflavonas durante a fermentação também se apresenta uma pesquisa futura para elucidar se esses compostos transformam-se de fato em isoflavonas biodisponíveis. A pesquisa para quantificar equol no “iogurte” de soja não é difícil de ser realizada, e pode obter-se esta informação a curto prazo sem maiores dificuldades. Se o resultado fosse positivo, seria outra característica funcional do “iogurte” desenvolvido, e acrescentaria mais valor ao produto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTIVE FOOD INGREDIENTS. **Application file**: fermented dairy products: doc. A8-90\*01/99. ORAFI. Belgium, 1999. 10p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 18**, de 3 de dezembro de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, DF, 3 dez. 1999a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 19**, de 10 de dezembro de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Brasília, DF, 10 dez. 1999b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

ALBALÁ-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by HPLC. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.778, p.247-253, 1997.

ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W. In: *Biotechnology Industrial. Processos fermentativos e enzimáticos* – v. 3. p. 593. Ed. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 2001.

ANDRES, E.; LOUKILI, N.H.; NOEL, E. Vitamin B<sub>12</sub> (cobalamin) deficiency in elderly patients. **CMAJ**, v.171, p.251-259, 2004.

APPLEBY, P. N.; THOROGOD, M.; MCPHERSON, K.; MANN, J. L. **Associations between plasma lipid concentrations and dietary, lifestyle and physical factors in the Oxford Vegetarian Study.** **Journal of Human Nutrition Diet**, v.8, p.305-314, 1995

ARAI, S. Studies on functional foods in Japan State of the art. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, n.1, p.9-15, 1996.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 1999. 416p.

ARUNACHALAM, K.D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, Cambridge, v.19, n.10, p.1559-1597, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analytical of the Association of Official Analytical Chemist**. 15.ed. Washington, DC, 1995. v.2.

AXEROLD, B.; CHEESEBROUGH, T.M.; LAAKSSO, S. Lipoxygenase from soybean. **Methods Enzymology**, v.71, p.441-451, 1981.

BARCELOS, P.M. de F. **Abordagem especial em alimentos vegetais com ênfase em produtos de soja**. Lavras: UFLA, 2008. 59p. (Textos acadêmicos).

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988. 813p.

BENNINK, M.R. Soy bean in the prevention and treatment of câncer. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2001. p.24-27.

BERHOW, M.A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B.S.; MANTHEY, J.A. (Ed.). **Flavonoids in the living cell**. New York: Klusher Academic, 2002. p.61-76.

BIO RICH. Disponível em <<http://www.linharich.com.br/>> acessado maio, 2007.

BRASIL. Instrução Normativa n. 36, de 31 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, p.22-23, 8 nov. 2000. Seção I.

BRZEZINSKI, A.; DEBI, A. Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators? **European Journal Obstetrics and Gynecology Reproduction Biology**, v.85, p.47-51, 1999.

CAMPOS, R.P. **Revestimentos biodegradáveis na conservação de morango orgânico “camarosa” armazenado sob refrigeração**. 2008. 90p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

CARETHERS, M. Diagnosing vitamin B<sub>12</sub> deficiency, a common geriatric disorder. **Geriatrics**, v.43, p.89, 1988.

CARMEL, R.; GREEN, R.; JACOBSEN, D.W. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities 1-3. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v.70, p.904-910, 1999.

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

CASTRO, A.T.B.; MILLAN, A.; LAGO, R.C.A. **Contribuição ao estudo da soja no Brasil**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar, 1973. 28p. (Boletim técnico, 10).

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica ilustrada**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2006. 533p.

CHUMCHUERE, S.; ROBINSON, R.K. Selection of starter culture for the fermentation of soya milk. **Food Microbiology**, London, v.16, p.129-137, 1999.

CIABOTTI, S. **Aspectos químicos, físico-químicos e sensoriais de extratos de soja e tofus obtidos dos cultivares de soja convencional e livre de lipoxigenase**. 2004. 122p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COMBS, G.F. **The vitamins-fundamental aspects in nutrition and health**. New York: Academic, 1992. 528p.

COUTO FILHO, J. de O. Avaliação clínica do uso da isoflavona em TRH (Projeto Piloto). In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2001. p.19-20.

CROCIANI, F.; ALESSANDRINI, A.; MUCCI, M.M.; BIAVATI, B. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.199-210, 1994.

DAVIES, C.S.; NIELSEN, N.C. Genetic análisis of a null-allele for lipoxygenase: 2., in soybean. **Crop science**, Madison, v.26, n.3, p.430-436, May/June 1986.

De ANGELIS, R.C. de. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde**: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu, 2001. 295p.

DIEL, P.; OLFF, S.; SCHMIDT, S.; MICHNA, H. Molecular Identification of potential selective estrogen receptor modulator (serm) like properties of phytoestrogens in the human breast cancer cell line mcf-7. **Planta Medicine**, v.67, p.510-514, 2001.

EVANS, D.E.; TSUKAMOTO, C.; NIELSEN, N.C. A small scale method for the production of soymilk and silken tofu. **Crop Science**, Madison, v.37, n.5, p.1463-1471, Sept./Oct. 1997.

FAILLACE, R.R. **Anemia da carência de ácido fólico, anemia perniciosa**. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?26>>. Acesso em: 5 maio 2007.

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

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 1095p.

FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa, MG: UFV, 2003. 205p.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FINEGOLD, S.M.; SUTTER, V.L.; MATHISEN, G.E. Normal indigenous intestinal flora. In: HENTGES, D.J. (Ed.). **Human intestinal microflora in health and disease**. New York: Academic, 1983. p.33-31.

FLICKER, A.L.; VASIKARAN, D.S.; THOMAS, J. Homocysteine and vitamin status in older people in Perth. **Medical Journal Australian**, Melbourne, v.180, p.539-540, 2004.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Informe del grupo de trabajo FAO/OMS sobre aspectos analíticos relacionados con la composición de los alimentos y calidad protéica**. 168 p. Roma, 2001.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Institute of Medicine. Dietary References Intakes. **Proposed definition and plan for review of dietary antioxidants and related compounds**. Washington, DC: National Academy, 1998. 706p.

FOX, P. F. **Food enzymology**. London: Elsevier Applied Science, 1991. 636p.

FRASER, G.E. Effect of Risk Factor Values on Lifetime Risk of and Age at First Coronary Event. The Adventist Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v.142, p.746-758, 1995.

FUCHS, R.H.B.; BORSATO, D.; BONA, E.; HAULY, M.C.O. "Iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.175-181, jan./mar. 2005.

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

FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; IGITA, K.; SUDA, L. DETBA value and hexanal production with the combination of unsaturated fatty acids and extracts prepared from soybeans seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.44, p.236-239, 1996.

FUTTERLEIB, A.; CHERUBINI, K. Importância da vitamina B<sub>12</sub> na avaliação clínica do paciente idoso. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.74-78, jan./mar. 2005.

GERMAN, B.; SCHIFFRIN, E.J.; RENIERO, R.; MOLLET, B.; PFEIFER, A.; NEESER, J. **The development of functional foods: lessons from the gut**. Washington, DC: Elsevier Science, 1999. 499p.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.130, p.391S-395S, 2000.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.125, p.1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. Gut fermentation and health advantages: myth or reality? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.81, p.83-84, 1999.

GIOVANNUCCI, E. Prospective Study of Plasma Fatty Acids and Risk of Prostate. **Cancer . Cancer Research**, Baltimore, v.54, p.2390-2397, 1994.

GOLDIM, B.R.; LICHTENSTEIN, A.H.; GORBACH, S.L. Nutritional and metabolic roles of intestinal flora. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed.). **Modern nutrition in health and disease**. 8.ed. London: Williams & Wilkins, 1994. v.1, p.569-582.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Use of small ruminants milks supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.85, p.839, 1998.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 10.ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 1982. 430p.

HAN, K.K.; KATI, L.M.; HAIDAR, M.A.; GIRÃO, M.J.B.C.; BARACAT, E.C.; YIM, D.K.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. Efeito de isoflavona sobre os sintomas da síndrome de climatério. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2001. p.28-32.

HAULY, M.C. de O.; FUCHS, R.H.B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.18, n.5, p.613-622, set./out. 2005.

HILDEBRAND, S.F.; HAMILTON-KEMP, T.R.; LEGG, C.S.; BOOKLANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties, and possible functions. **Current Topics Plant Biochemistry Physiology**, v.7, p.201-219, 1988.

HILLMAN, R.S. **Agentes hematopoiéticos**: fatores de crescimento, sais minerais e vitaminas em bases farmacológicas da terapêutica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 873p.

HOLLMAN, P.C.; SLANGEN, J.H.; WAGSTAFFE, J.P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D.A.T.; FINGLAS, P.M. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. **Analyst**, v.118, p.481-488, 1993.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.41, p.85-101, 1998.

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

JACKSON, C.J.C.; DINI, J.P.; RUPASINGHE, H.P.V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, Oxford, v.37, n.10, p.1117-1123, May 2002.

JEEJEEBHOY, K.N. Vegetable proteins: are they nutricionally equivalent to animal protein? **European Journal Gastroenterology Hepatology**, n.12, p.1-2, 2000.

JENKINS, W.M.; MACFARLANE, T.W.; FERGUSON, M.M. Nutritional deficiency in oral candidosis. **International Journal Oral Surgery**, v.6, p.204-210, 1977.

JOHNSON, M.A.; HAWTHORNE, N.A.; BRACKETT, W.R. Hiperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency in elderly using Title IIIc nutrition services1-3. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v.77, p.211-220, 2003.

KAMALY, K.M. Bifidobacteria fermentation of soybean milk. **Food Research International**, Berking, v.30, n.9, p.675-682, 1997.

KAMER, J.H. van de; GINKEL, L. van. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.29, n.4, p.239-251, July 1952.

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212<sup>AL</sup>. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.1209-1234.

KELLY, N.D.G. The coenzyme forms of vitamin B12: toward an understanding of their therapeutic potential. **Alternative Medical Review**, v.2, p.459-471, 1997.

KIM, J.S.; KWON, C.S. Estimated dietary isoflavone intake of Korean population based on national nutrition survey. **Nutrition Research**, Oxford, v.21, n.7, p.947-953, July 2001.

KLAVER, F.A.M.; KIGMAN, F.; WEERKAMP, A.H. Growth and survival of bifido bacteria in milk. **Netherland Milk and Dairy Journal**, Netherlands, v.47, p.151-164, 1993.

KNIGHT, H.; EDEN, J.A. Effects of phytoestrogens. **Obstetrics and Gynecology**, n.87, p.897-904, 1996.

KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARISSON, B. Interation estrogenic chemical and phytoetrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v.139, p.4252-4263, 1986.

KURMMANN, J.A.; RASIC, J.L. The health potential of products containing bifidobacteria. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). **Therapeutic properties of fermented milks**. London: Elsevier Applied Science, 1991. p.117-157.

LA JUSTICIA BERGASA, A.M. **Os problemas do adulto**. Madrid: Plaza & Janes, 1986. 222p.

LIENER, I.E. Implications of antinutricional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.34, n.1, p.31-67, Jan. 1994.

LIM, B.T.; DEMAN, M.J.; DEMAN, L.; BUZZEL, R.I. Yiel and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics: calcium sulfate coagulant. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.4, p.1088-1092, July/Aug. 1990.

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

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v.69, p.1035S-1045S, 1999. Supplement.

MACRAE, R. HPLC determination of vitamins. **Journal Mieronut. Analitic**, v.7, p.247-260, 1990.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. (Ed.). **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10.ed. São Paulo: Roca, 2002. 1156p.

MARANHÃO, M.F.C. Benefícios da soja para o coração e a saúde. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2001. p.21-23.

MARSHALL, V.M.; COLE, W.M. Threonine aldolase and aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.50, p.375-379, 1983.

MARTEAU, P.; RAMBAUD, J.C. Potencial of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. **FEMS Microbiology Reviews**, Haren, v.12, p.207-220, 1993.

MATOBA, T.; HIDAKA, H.; NARITA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N.; KITO, M. Lipxygenase: 2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybeans homogenate. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.33, p.852-855, 1985.

MEDICAL memoranda: vitamin B<sub>12</sub> (from *Streptomyces Griseus*) in Pernicious Anaemia. **British Medical Journal**, v.1, n.4665, p.1302, June 1950.

MESSINA, M.; GUGGER, E.T.; ALEKEL, D.L. Soy protein, soybean isoflavones and bone health: a review of the animal and human data. **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**, v.5, p.77-90, 2001.

METCHNIKOFF, E. **The prolongation of life**: optimistic studies. London: Heineman, 1910. 372p.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295p.

MITAL, B.K.; GARG, S.K. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. **Food Reviews International**, v.8, n.3, p.347-389, 1992.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v.6, p.263-268, 1990.

MONDRAGÓN, O.L.B.; MAUGERI FILHO, F. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos**. Campinas: Unicamp, 2004. 85p.

MORAIS, A.A.C. de. Usos da soja em medicina. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2001. p.15-18.

MORO, E. Über den Bacillus acidophilus n. spec. Ein Beitrag zur Kenntnis der normalen Darmbakterien des Säuglings (*Bacillus acidophilus* n. spec. A contribution to the knowledge of the normal intestinal bacteria of infants). **Jahrbuch für Kinderheilkunde**, Berlin, v.52, p.38-55, 1900.

MURPHY, P.A.; BARUA, K.; HAUCK, C.C. Solvent extraction in the determination of isoflavones in soy foods. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.777, n.1, p.129-138, Sept. 2002.

MURPHY, P.A.; SONG, T.; BUSEMAN, G. Isoflavones in retail and institutional foods. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.47, p.2697-2704, 1999.

NAHAISI, M.H. *Lactobacillus acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). **Developments in food microbiology**. London: Elsevier Applied Science, 1986. chap.6, p.153-178.

NELSON, A.L.; STEINBERG, M.P.; WEI, S.L. Illinois process for preparation of soymilk. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.3, p.86-88, Mar. 1997.

NICHOLSON, J. Dando trela às bactérias. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n.75, p.26-27, 2008.

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

PAK, N. Inulina y fructooligosacáridos: propiedades nutricionales y funcionales. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. de. **Carbohidratos em alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo: Edusp, 2006. p.337-356.

PARK, Y.K. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.31, n.2, p.200, 1999.

PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.P. Biotransformação de  $\beta$ -glicosil isoflavonas de soja em isoflavonas agliconas por  $\beta$ -glicosidase Fúngica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2001. p.33-36.

PENNINGTON, J. de. **Bowe's and churh' food values of portions commonly used**. 17.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. 496p.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JUNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados**: métodos analíticos. 2.ed. Juiz de Fora: Templo, 2001. 234p.

PEREIRA, M.C.A. **Efeito das farinhas de polpa e de casca de banana e do fermentado de quefir nos níveis glicêmicos e lipídicos de ratos**. 2007. 132p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLUCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais**: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela, 2005. 95p.

PLUMMER, S.; WEAVER, M.A.; HARRIS, J.C.; DEE, P.; JUNTER, J. Estudio piloto de Clostridium difficile: efecto del aporte suplementario de probióticos sobre la incidencia de diarrea causada por C. difficile. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n.1, p.59-62, 2004. Disponível em: <[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-67092004000100009&lng=es&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-67092004000100009&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 21 mar. 2009.

POLESELLO, A.; RIZZOLO, A. Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2., a review 1985-1989. **Journal Mieronut. Analitic**, v.8, p.105-158, 1990.

POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. **Ciencia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1999. 667p.

PRUTHI, R.K.; TEFFERI, A. Pernicious anemia revisited. **Mayo Clinics Procedure**, v.69, p.144-150, 1994.

RASIC, J.L. Cultured media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **Bulletin International Dairy Fed.**, n.252, p.24-34, 1990.

RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. Bifidobacteria and their role. **Basiléia Birkhäuser**, v.39, p.1-295, 1993.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2004. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

RASTALL, R.A.; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, n.13, p.490-496, 2002.

ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; CABRAL, L.M.C.; CABRAL, L.C.; FARIAS, C.A.A.; DOMINGUES, A.M. Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. **Food Control**, Guildford, v.14, p.187-192, 2003.

RYCROFT, C.E.; JONES, M.R.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides, **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, p.878-887, 2001.

SAARELA, M.; GUNNAR, M.; RANGNE, F.; JAANA, M.; TIINA, M.S. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.70, p.347-358, 1996.

SARRUGE, J.R.R.; HAAG, H.P. **Análise química em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1974. 56p.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. de. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001.

- SCHWAN, R.F. **Biotecnologia das fermentações**. Lavras: UFLA, 2007. 12p. Apostila.
- SESHADRI, S.; BEISER, A.; SELHUB, J. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **New England Journal Medical**, London, v.346, p.476-483, 2002.
- SETCHEL, K.D.; BROWN, N.M.; DESAI, P. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.131, p.162S-1375S, 2001.
- SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v.2, n.1/2, p.7-19, 1999.
- SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. In: WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. (Ed.). **The lactic acid bacteria: the genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic, 1995. v.2, chap.8, p.279-306.
- SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9.ed. São Paulo: Manole, 2003. v.2, 2112p.
- SHIMAKAWA, Y.; MATSUBARA, S.; YUKI, N.; IKEDA, M.; ISHIKAWA, F. Evaluation of *Bifidobacterium breves* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, n.2, p.131-136, 2003.
- SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. **The book of tempeh**. New York: Harper & Row, 1979. 158p.
- SILVA, M.R.; FERREIRA, C.L.L.F.; COSTA, N.M.B.; MAGALHÃES, J. Elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada à base de soro de leite fortificada com ferro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.56, n.3, p.7-14, 2001.
- SLYWITCH, E. **Alimentação sem carne**. São Paulo: Palavra Impresa, 2006. 112p.
- SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. **Soybeans: chemistry and technology**. Westport: The Avi, 1978. v.1, 470p.

SPECKER, B.L. Increased urinary methylmalonic acid excretion in breast-fed infants of vegetarian mothers and identification of an acceptable dietary source of vitamin B<sub>12</sub>. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v.47, p.89, 1988.

STABLER, S.P. Screening the older population for cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) deficiency. **Journal American Geriatric Society**, New York, v.43, p.1290-1297, 1995.

STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency as a worldwide problem. **Annual Review Nutrition**, v.24, p.299-326, 2004.

STANGER, O.; HERRMANN, W.; PIETRZIK, K.D.A.C.H. **Liga homocystein**: consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid, and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. Disponível em: <<http://www.dach-liga-homocystein.org/en/index.html>>. Acesso em: 20 maio 2007.

TAKETA, S.T. **Comportamento da soja (Glycine Max (L.) Merrill) com ausência de três isoenzimas lipoxigenase, em diferentes épocas de plantio, em duas localidades de Minas Gerais**. 2000. 69p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yogurt: science and technology**. Oxford: Pergamon, 1985. 431p.

TARANTO, M.P.; VERA, J.L.; HUGENHOLTZ, J. Lactobacillus reuteri CRL1098 produces cobalamin. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.5643-5647, 2003.

THOMPSON, W.G.; CASSINO, C.; BABITZ, L. Hypersegmented neutrophils and vitamin B<sub>12</sub> deficiency: hypersegmentation in B<sub>12</sub> deficiency. **Acta Haematology**, v.81, p.186-191, 1989.

THOMPSON, W.G.; FREEDMAN, M.L. Vitamin B<sub>12</sub> and geriatrics: unanswered questions. **Acta Haematology**, v.82, p.169-174, 1989.

THOROGOOD, M. The epidemiology of vegetarianism and health. **Nutrition Research Review**, v.8, p.179, 1995.

TISSIER, M.H. La reaction chromophile d'Escherich et Bacterium Coli. **Society Biology**, v.51, p.943-945, 1899.

TOH, B.H.; DRIEL, I.R. van; GLEESON, P.A. Pernicious anemia. **New England Journal Medical**, London, v.337, p.1441-1448, 1997.

TRUCOM, C. **Soja: nutrição e saúde**. São Paulo: Alaúde, 2005. 136p.

UMBELINO, D.C.; CARDELLO, H.M.; ROSSI, E.A. Efeito de diferentes sais de ferro sobre as características sensoriais do “iogurte” de soja. **Archives Latinoamericano Nutrition**, v.51, n.2, p.199-203, 2001.

UMBELINO, D.C.; ROSSI, E.A.; CARDELLO, H.M.; LEPERA, J.S. Aspectos tecnológicos e sensoriais do “iogurte” de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.276-280, 2001.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Soystats**. Disponível em: <<http://www.soystats.com/2007/industrialuses.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

VILAS BOAS, E.V.B. **Avaliação nutricional dos alimentos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 47p.

VINDEROLA, C.G.; PROSELHO, W.; GHIBERTO, T.D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1905-1911, 2000.

WANG, H.L.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in comercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.42, n.8, p.1666-1673, Aug. 1994.

WANG, Y.; YU, R.; CHOU, C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, London, v.23, p.128-135, 2006.

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P. Candida: associated denture stomatitis: a etiology and management: a review: part 2: oral diseases caused by candida species. **Australian Dental Journal**, Melbourne, v.43, p.160-166, 1998.

WEHLING, R.L.; WETZEL, D.L. Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin and thiamin in fortified cereals products by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.32, p.1326-1331, 1984.

WEUSTEN, B.L.M.A. Wiel A: aphthous ulcers and vitamin B<sub>12</sub> deficiency. **Netherlands Journal Medical**, Netherlands, v.53, p.172-175, 1998.

WILLIAMS, S.R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. 668p.

WOLTERS, M.; STRÖHLE, A.; HAHN, A. Altersassoziierte veränderungen im vitamin-B<sub>12</sub> und folsäurestoff wechsel: prävalenz, atiopathogenese und pathophysiologische konsequenzen. **Z. Gerontology Geriatrics**, v.37, p.109-135, 2004.

YAESHIMA, T. Benefits of bifidobacteria to human health. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.313, p.36-42, 1996.

ZITTOUN, J.; ZITTOUN, R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. **Semin Hematology**, v.36, p.35-46, 1999.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>1</b> Semelhança entre a molécula de estradiol (estrógeno humano) e equol (fitoestrógeno).....	10
<b>2</b> Oligossacarídeos rafinose e estaquiose.....	14
<b>3</b> Produtos finais primários do metabolismo de microorganismos.....	21
<b>4</b> Valor terapêutico dos Probióticos.....	30
<b>5</b> Efeitos da ingestão moderada de inulina sobre Bifidobactérias no intestino humano.....	36
<b>6</b> Modelo de regressão segundo equação quadrática (parábola) para resultados de vitamina B <sub>12</sub> em diferentes tempos de fermentação. Experimento 2.....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>1</b> Países que se destacaram na produção mundial de soja entre 2000 e 2007.....	7
<b>2</b> Síntese de vitaminas por diferentes Bifidobactérias.....	26
<b>3</b> RDA para vitamina B <sub>12</sub> .....	43
<b>4</b> Fontes de vitamina B <sub>12</sub> em alimentos.....	45
<b>5</b> Composição centesimal do grão, extrato e “iogurte” de soja.....	64
<b>6</b> Valores médios de ph e acidez titulável do extrato e “iogurtes” de soja.....	66
<b>7</b> Teor de minerais para o extrato e “iogurtes” de soja.....	68
<b>8</b> Teores médios de isoflavonas do grão, extrato e “iogurtes” de soja.....	70
<b>9</b> Comparação, por meio de contrastes, dos teores médios de isoflavonas do extracto e “iogurtes” de soja .....	73
<b>10</b> Valores médios da vitamina B <sub>12</sub> nos “iogurtes” de soja fermentados por 6 horas. Experimento 1.....	76

<b>11</b> Valores médios de pH dos extratos de soja em diversos tempos de fermentação.....	79
<b>12</b> Teores de B <sub>12</sub> no “iogurte” de soja, em alguns productos láteos adquiridos no comercio de Lavras – MG e analisados neste estudo, e productos láteos conforme Coms (2002).....	81

## ANEXO A

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1A</b> Resumo das análises de variância para vitamina B <sub>12</sub> .....	106
<b>Tabela 2A</b> Test de Tukey para comparação da produção da vitamina B <sub>12</sub> nas diversas formulações de “iogurtes” de soja.....	106
<b>Tabela 3A</b> Resumo da análise de variância para resultados de vitamina B <sub>12</sub> em diversos tempos de fermentação. Experimento 2.....	107
<b>Tabela 4A</b> Análise de variância para valores médios de teor de isoflavonas do experimento 1, tempo 6 h. de fermentação....	107
<b>Tabela 5A</b> Contraste 1: Extrato de soja vs. “iogurtes”.....	108
<b>Tabela 6A</b> Contraste 2: “iogurtes” com prebióticos vs. “iogurtes” sem prebióticos adicionados.....	109
<b>Tabela 7A</b> Contraste 3: Entre os “iogurtes” sem prebióticos adicionados: sem glucose VS com glucose.....	110
<b>Tabela 8A</b> Contraste 4: “iogurte” com maior teor de prebióticos vs. “iogurtes” com quantidades inferiores de prebióticos.....	111
<b>Tabela 9A</b> Contraste 5: Entre “iogurtes” com quantidades inferiores de prebióticos.....	112

<b>Tabela 10A</b> Resultados da quantificação da vitamina B <sub>12</sub> no experimento 1 com três repetições.....	113
<b>Tabela 11A</b> Resultados do experimento 2 (valores médios de teor de B <sub>12</sub> em diferentes tempos de fermentação).....	114
<b>Tabela 12A</b> Quantificação da vitamina B <sub>12</sub> em diferentes produtos lácteos...	115
<b>Tabela 13A</b> Resultados dos teores de isoflavonas (mg /100g) no extrato de soja.....	115
<b>Tabela 14A</b> Resultados dos teores de isoflavonas (mg /100g) nos “iogurtes” de soja, experimento 1.....	116
<b>Tabela 15A</b> Descrição dos tratamentos do experimento 1 para isoflavonas...	117

## ANEXO A

**TABELA 1A** Resumo da análise de variância para vitamina B<sub>12</sub>, 6 h. de fermentação. Experimento 1.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA				
FV	GL	SQ	QM	Fc $\alpha > F_c$
TRAT	4	465.429293	116.357323	0.312 0.8625
REP	2	889.417773	444.708887	1.191 0.3525
erro	8	2986.773827	373.346728	
Total corrigido	14	4341.620893		
CV (%) =	23.92			
Média geral:	80.7706667		Número de observações:	15

. Não existe diferença entre os tratamentos estudados.

### Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 54,5198403526926 NMS: 0,05  
Média  $\square$ armônica do número de repetições @: 3  
Erro padrão: 11,1556671447495

**TABELA 2A** Teste de Tukey: valores médios de teor de B<sub>12</sub> – Experimento 1.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	73.750000	a1
1	74.160000	a1
3	85.013333	a1

5 85.266667 a1  
 4 85.663333 a1

---

**TABELA 3A** Resumo da análise de variância para resultados de vitamina B<sub>12</sub> em diferentes tempos de fermentação – Experimento 2.

---

**TABELA DE ANÁLISE DE VARIANCIA**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TEMPO	5	16198.166667	3239.633333	480.064	0.0000
REP	2	8.890000	4.445000	0.659	0.5386
erro	10	67.483333	6.748333		
Total corrigido	17	16274.540000			

---

CV (%) = 8.76  
 Média geral: 29.6666667 Número de observações: 18  
 . Existe diferença entre os tratamentos (tempos) (p=0,0000).  
 . Não existe diferença significativa entre os dias (blocos) (p=0,5386)  
 . CV(%) = 8,76%

**TABELA 4A** Análise de variância para valores médios de teor de isoflavonas, experimento 1, tempo 6 h. de fermentação.

---

**TABELA DE ANÁLISE DE VARIANCIA**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	5	268991.146694	53798.229339	63.183	0.0000
erro	12	10217.615400	851.467950		

---

Total corrigido 17 279208.762094

CV (%) = 13.66

Média geral: 213.6405556 Número de observações: 18

. Existe diferença entre os tratamentos (p=0,000).

. CV(%) = 13,66%

**TABELA 5A** Contraste 1: Extrato de soja vs. “iogurtes”.

O contraste testado está apresentado a seguir:

Nível dessa Fonte de Variação Coeficientes

0	5.0000
1	-1.0000
2	-1.0000
3	-1.0000
4	-1.0000
5	-1.0000

Obs. Valores dos coeficientes positivos foram divididos por 5 e os negativos por 5

Estimativa : 238.33933333  
DMS Scheffé : 72.72620334  
NMS: : 0,05  
Variância : 340.58718000  
Erro padrão : 18.45500420  
t para H0: Y = 0 : 12.915  
Pr>|t| : 0.000  
F para H0: Y = 0 : 166.787  
Pr>F : 0.000  
Pr exata Scheffé : 0.000

. O extrato de soja apresentou teor médio de isoflavonas 238,3 mg/100g maior que a média dos “iogurtes” (p=0,000).

**TABELA 6A** Contraste 2“iogurtes” com prebióticos vs. “iogurtes” sem prebióticos

-----  
 O contraste testado está apresentado a seguir:  
 -----

Nível dessa Fonte de Variação Coeficientes

0	0.0000
1	3.0000
2	-2.0000
3	-2.0000
4	-2.0000
5	3.0000

-----  
 Obs. Valores dos coeficientes positivos foram divididos por 6 e os negativos por 6  
 -----

Estimativa	:	145.62944444
DMS Scheffé	:	60.60516945
NMS:	:	0,05
Variância	:	236.51887500
Erro padrão	:	15.37917017
t para H0: Y = 0	:	9.469
Pr> t	:	0.000
F para H0: Y = 0	:	89.667
Pr>F	:	0.000
Pr exata Scheffé	:	0.000

-----  
 . Os “iogurtes” sem prebióticos acrescentados apresentaram, em média, teor de isoflavonas 145,6 mg/100g maior que o teor de isoflavonas médio apresentado pelos “iogurtes” com prebióticos adicionados (p=0, 000).

**TABELA 7A** Contraste 3: Entre os “iogurtes” sem prebióticos: sem glucose VS com glucose

-----  
 O contraste testado está apresentado a seguir:  
 -----

Nível dessa Fonte de Variação	Coefficientes
0	0.0000
1	1.0000
2	0.0000
3	0.0000
4	0.0000
5	-1.0000

-----  
 Obs. Valores dos coeficientes positivos foram divididos por 1 e os negativos por 1  
 -----

Estimativa	:	172.55000000
DMS Scheffé	:	93.88912479
NMS:	:	0,05
Variância	:	567.64530000
Erro padrão	:	23.82530797
t para H0: Y = 0	:	7.242
Pr> t	:	0.000
F para H0: Y = 0	:	52.451
Pr>F	:	0.000
Pr exata Scheffé	:	0.000

-----  
 . O “iogurte” sem glucose apresentou maior teor de isoflavonas que o “iogurte” com glucose, 172, 6 mg/100g (p=0, 000).  
 -----

**TABELA 8A** Contraste 4: “iogurte” com maior quantidade de prebióticos VS “iogurtes” com quantidades inferiores de prebióticos

-----  
 O contraste testado está apresentado a seguir:  
 -----

Nível dessa Fonte de Variação Coeficientes  
 -----

0	0.0000
1	0.0000
2	2.0000
3	-1.0000
4	-1.0000
5	0.0000

-----  
 Obs. Valores dos coeficientes positivos foram divididos por 2 e os negativos por 2  
 -----

Estimativa : -49.41333333  
 DMS Scheffé : 81.31036721  
 NMS: : 0,05  
 Variância : 425.73397500  
 Erro padrão : 20.63332196  
 t para H0: Y = 0 : -2.395  
 Pr>|t| : 0.034  
 F para H0: Y = 0 : 5.735  
 Pr>F : 0.034  
 Pr exata Scheffé : 0.389  
 -----

. “iogurte” com maior quantidade de prebióticos apresentou teor médio de isoflavonas menor que a media dos “iogurtes” com quantidades inferiores de prebióticos (-49,4 mg/100g) (p=0, 034).

**TABELA 9A** Contraste 5: Entre “iogurtes” com quantidades inferiores de Prebióticos

```

-----
O contraste testado está apresentado a seguir:
-----
Nível dessa Fonte de Variação Coeficientes
-----
          0          0.0000
          1          0.0000
          2          0.0000
          3          1.0000
          4         -1.0000
          5          0.0000
-----
Obs. Valores dos coeficientes positivos foram divididos por
    1 e os negativos por 1
-----
Estimativa      :      26.89333333
DMS Scheffé     :      93.88912479
NMS:            :      0,05
Variância       :      567.64530000
Erro padrão     :      23.82530797
t para H0: Y = 0 :      1.129
Pr>|t|          :      0.281
F para H0: Y = 0 :      1.274
Pr>F            :      0.281
Pr exata Scheffé :      0.929
-----

```

. Os contrastes com quantidades inferiores de prebióticos são estatisticamente iguais.

**TABELA 10A** Resultados da quantificação da vitamina B<sub>12</sub> no experimento 1 com três repetições.

Tratamentos	Descrição	µg/100g de vitamina B <sub>12</sub>	Médias em µg/100g
Tr1(a)	Extrato de soja + probióticos	62,77	74,16
Tr1(b)	Extrato de soja + probióticos	73,57	
Tr1(c)	Extrato de soja + probióticos	86,14	
Tr2(a)	Extrato de soja+142,4g/L de oligofrutose + 44,3g/L de inulina + probióticos	66,99	73,75
Tr2(b)	Extrato de soja+142,4g/L de oligofrutose + 44,3g/L de inulina + probióticos	55,21	
Tr2(c)	Extrato de soja+142,4g/L de oligofrutose + 44,3g/L de inulina + probióticos	99,05	
Tr3(a)	Extrato de soja + 71g/L de oligofrutose + 22g/L de inulina + probióticos	64,87	85,01
Tr3(b)	Extrato de soja + 71g/L de oligofrutose + 22g/L de inulina + probióticos	87,75	
Tr3(c)	Extrato de soja + 71g/L de oligofrutose + 22g/L de inulina + probióticos	102,42	
Tr4(a)	Extrato de soja + 35,5g/L de oligofrutose + 11g/L de inulina + probióticos	86,70	85,66
Tr4(b)	Extrato de soja + 35,5g/L de oligofrutose + 11g/L de inulina + probióticos	90,70	
Tr4(c)	Extrato de soja + 35,5g/L de oligofrutose + 11g/L de inulina + probióticos	79,59	
Tr5(a)	Extrato de soja + 80g/L de glucose	114,05	

Tr5(b)	de milho “Karo” + probióticos Extrato de soja + 80g/L de glucose	54,28	85,26
Tr5(c)	de milho “Karo” + probióticos Extrato de soja + 80g/L de glucose	87,47	

**TABELA 11A** Resultados do experimento 2 (valores médios de teor de B<sub>12</sub> em diferentes tempos de fermentação).

Tratamentos	Descrição	µg/100g de vitamina B <sub>12</sub>	Médias em µg/100g
0 h.(a)	Tempo 0 de fermentação	0	
0 h.(b)	Tempo 0 de fermentação	0	0
0 h.(c)	Tempo 0 de fermentação	0	
2 h.(a)	Tempo 2 h. de fermentação	0	
2 h.(b)	Tempo 2 h. de fermentação	0	0
2 h.(c)	Tempo 2 h. de fermentação	0	
3 h.(a)	Tempo 3 h. de fermentação	23,50	
3 h.(b)	Tempo 3 h. de fermentação	18,50	20,83
3 h.(c)	Tempo 3 h. de fermentação	20,50	
4 h.(a)	Tempo 4 h. de fermentação	22,50	
4 h.(b)	Tempo 4 h. de fermentação	22,00	22,50
4 h.(c)	Tempo 4 h. de fermentação	23,00	
5 h.(a)	Tempo 5 h. de fermentação	49,00	
5 h.(b)	Tempo 5 h. de fermentação	49,00	49,00
5 h.(c)	Tempo 5 h. de fermentação	49,00	

**TABELA 12A** Quantificação da vitamina B<sub>12</sub> em diferentes produtos lácteos.

Produto	µg/100g de vit. B <sub>12</sub>	Médias em µg/100g
Iogurte convencional (1)	0	0
Iogurte convencional (2)	0	
Kefir (1)	25,5	24,5
Kefir (2)	23,5	
Bebida Láctea (1)	0	0
Bebida Láctea (2)	0	
Leite fermentado (1)	0	0
Leite fermentado (2)	0	

**Obs.:** todos os produtos lácteos analisados foram obtidos do comércio local a exceção do Kefir que foi elaborado caseiramente. O Kefir foi o único produto que teve teor de vitamina B<sub>12</sub> presente na sua composição.

**TABELA 13A** Resultados das quantidades de isoflavonas em mg /100g no extrato de soja.

mg isoflavona/100g amostra(extrato de soja)			
<b>Isoflavonas:</b>	<b>T0(a)</b>	<b>T0(b)</b>	<b>T0(c)</b>
Malonil- Glicitina	31,03	32,58	31,41
Malonil- Genistina	117,67	117,89	115,39
Malonil – Daidzina	106,13	109,83	106,43
Glicosil- Glicitina	10,51	10,66	10,68
Glicosil- Genistina	46,38	46,49	45,67
Glicosil- Daidzina	37,11	37,00	37,14
Gliciteina(Aglicona)	10,23	12,09	11,02
Genisteina(Aglicona)	34,52	34,90	34,37

Daidzeína(Aglicona)	17,07	16,44	16,13
Acetil-Glicitina	0,00	0,00	0,00
Acetil-Genistina	0,00	0,00	0,00
Acetil-Daidzina	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>410,64</b>	<b>417,89</b>	<b>408,24</b>

**TABELA 14A** Resultados das quantidades de isoflavonas em mg /100g nos extrato fermentados de soja segundo 5 tratamentos e 3 repetições.

mg isoflavona/100g amostra (5 tratamentos)															
<b>Isoflavonas</b>	<b>T1a</b>	<b>T1b</b>	<b>T1c</b>	<b>T2a</b>	<b>T2b</b>	<b>T2c</b>	<b>T3a</b>	<b>T3b</b>	<b>T3c</b>	<b>T4a</b>	<b>T4b</b>	<b>T4c</b>	<b>T5a</b>	<b>T5b</b>	<b>T5c</b>
Malonil-Glicitina	29,3	26,7	18,9	5,9	5,9	5,9	12,0	9,7	10,2	9,4	8,3	8,4	13,6	12,7	13,4
Malonil-Genistina	96,7	107,6	71,6	20,6	24,1	21,6	35,4	37,1	38,1	35,6	31,4	33,3	42,7	46,3	46,4
Malonil - Daidzina	64,1	81,6	65,5	19,2	17,6	15,6	32,8	35,5	35,0	27,0	24,6	22,9	37,3	34,6	34,0
Glicosil-Glicitina	11,2	8,3	7,4	4,7	3,8	4,3	4,7	6,7	6,9	2,1	2,3	3,8	8,5	9,9	9,0
Glicosil-Genistina	56,9	51,9	35,5	11,8	11,0	9,4	20,8	18,1	15,6	15,1	15,3	16,0	20,3	22,1	22,6
Glicosil-Daidzina	43,4	44,0	23,4	9,0	8,9	7,5	16,7	14,8	14,7	11,4	11,9	11,1	16,0	16,9	15,8
Gliciteína (Aglicona)	8,3	10,9	5,0	2,0	2,2	1,0	2,9	2,4	2,4	2,5	3,1	2,6	3,5	5,0	5,0
Genisteína (Aglicona)	44,8	44,3	26,1	8,4	8,7	6,9	14,4	13,9	12,9	11,2	13,4	14,2	15,9	19,9	20,0
Daidzeína (Aglicona)	22,7	23,1	12,9	4,1	4,2	3,4	6,9	6,7	6,4	5,3	6,7	7,0	7,7	10,0	10,1
Acetil-Glicitina	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acetil-Genistina	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acetil-Daidzina	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<b>Total</b>	<b>377,7</b>	<b>398,5</b>	<b>266,5</b>	<b>85,9</b>	<b>86,7</b>	<b>75,6</b>	<b>146,7</b>	<b>144,9</b>	<b>145,0</b>	<b>119,6</b>	<b>116,9</b>	<b>119,4</b>	<b>171,5</b>	<b>177,3</b>	<b>176,3</b>
--------------	--------------	--------------	--------------	-------------	-------------	-------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

**TABELA 15A** Descrição dos tratamentos do experimento 1 para isoflavonas.

<b>Amostra</b>	<b>Descrição</b>
<b>T0a</b>	Extrato de soja
<b>T0b</b>	Extrato de soja
<b>T0c</b>	Extrato de soja
<b>T1a</b>	Extrato de soja + probióticos
<b>T1b</b>	Extrato de soja + probióticos
<b>T1c</b>	Extrato de soja + probióticos
<b>T2a</b>	Extrato de soja+142,4g/L de oligofrutose + 44,3g/L de inulina + probióticos
<b>T2b</b>	Extrato de soja+142,4g/L de oligofrutose + 44,3g/L de inulina + probióticos
<b>T2c</b>	Extrato de soja+142,4g/L de oligofrutose + 44,3g/L de inulina + probióticos
<b>T3a</b>	Extrato de soja + 71g/L de oligofrutose + 22g/L de inulina + probióticos
<b>T3b</b>	Extrato de soja + 71g/L de oligofrutose + 22g/L de inulina + probióticos
<b>T3c</b>	Extrato de soja + 71g/L de oligofrutose + 22g/L de inulina + probióticos
<b>T4a</b>	Extrato de soja + 35,5g/L de oligofrutose + 11g/L de inulina + probióticos
<b>T4b</b>	Extrato de soja + 35,5g/L de oligofrutose + 11g/L de inulina + probióticos
<b>T4c</b>	Extrato de soja + 35,5g/L de oligofrutose + 11g/L de inulina + probióticos
<b>T5a</b>	Extrato de soja + 80g/L de glucose de milho “Karo” + probióticos
<b>T-b</b>	Extrato de soja + 80g/L de glucose de milho “Karo” + probióticos
<b>T5c</b>	Extrato de soja + 80g/L de glucose de milho “Karo” + probióticos

## ANEXO B

	Página
<b>Figura 1B</b> Cromatograma do padrão de vitamina B <sub>12</sub> .....	119
<b>Figura 2B</b> Cromatograma de quantificação da vitamina B <sub>12</sub> (6 h de fermentação), T1. Experimento 1.....	120
<b>Figura 3B</b> Cromatograma de quantificação da vitamina B <sub>12</sub> (6 h de fermentação), T2. Experimento 1.....	121
<b>Figura 4B</b> Cromatograma de quantificação da vitamina B <sub>12</sub> (6 h de fermentação), T3. Experimento 1.....	122
<b>Figura 5B</b> Cromatograma de quantificação da vitamina B <sub>12</sub> (6 h de fermentação), T4. Experimento 1.....	123
<b>Figura 6B</b> Cromatograma de quantificação da vitamina B <sub>12</sub> (6 h de fermentação), T5. Experimento 1.....	124
<b>Figura 7B</b> Cromatograma de quantificação da vitamina B <sub>12</sub> (3 h de fermentação). Experimento 2.....	125

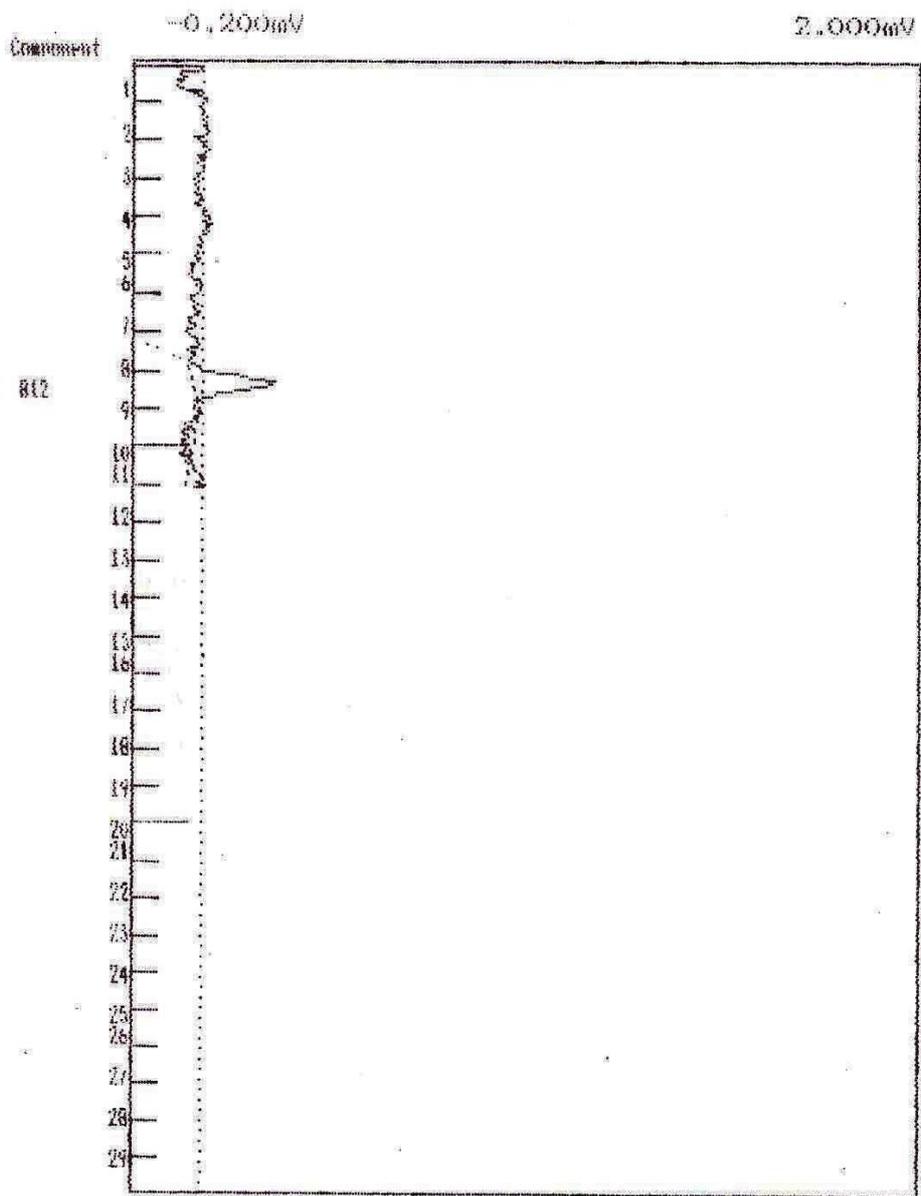
**Figura 8B** Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub>  
(4 h de fermentação). Experimento 2.....126

**Figura 9B** Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub>  
(5 h de fermentação). Experimento 2.....127

**Figura 10B** Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> no Kefir.  
Experimento 2.....128

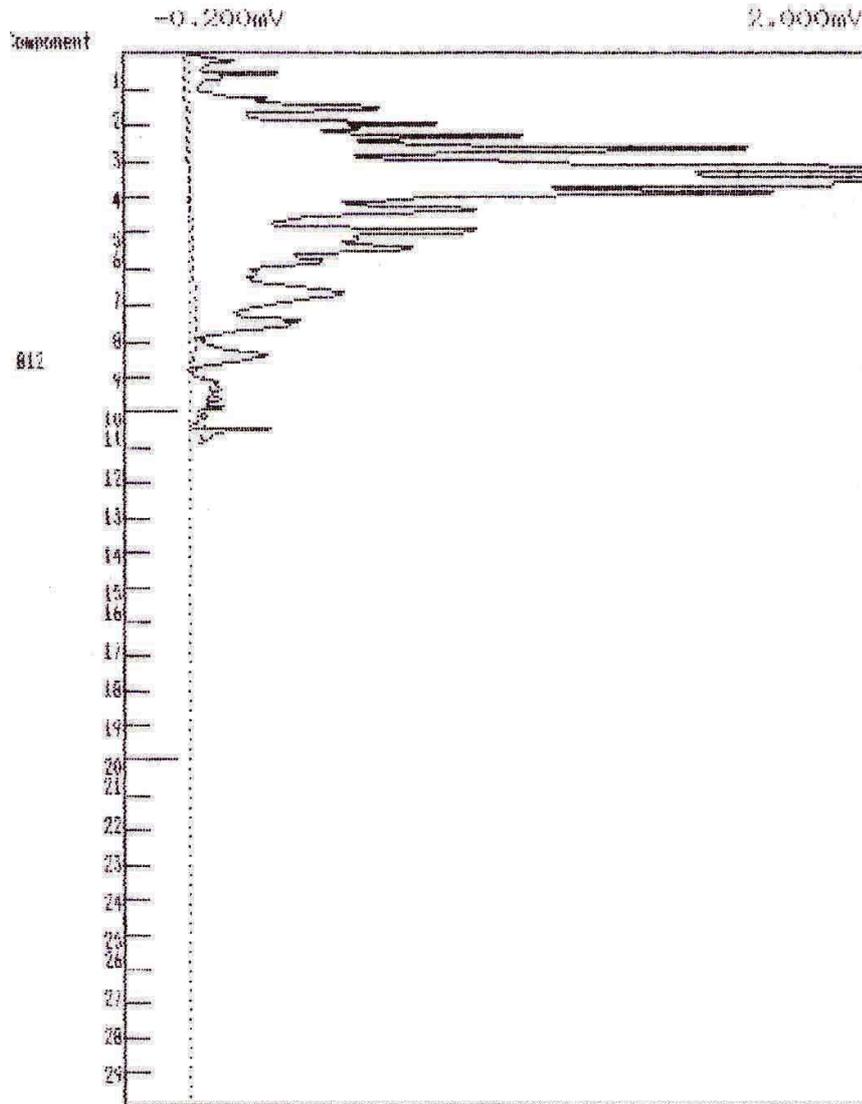
**FIGURA 1 B**

Cromatograma do padrão de vitamina B<sub>12</sub>



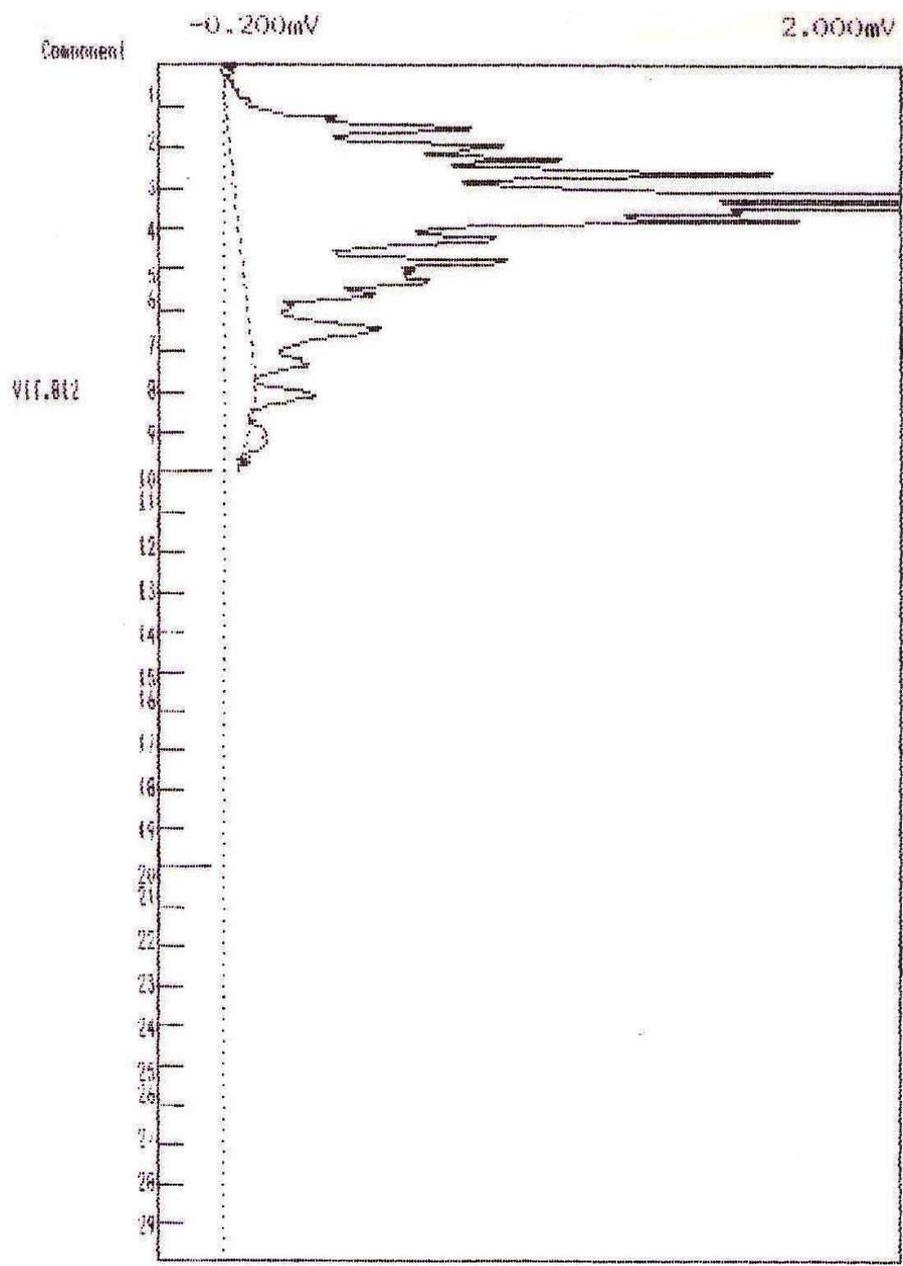
**FIGURA 2 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (6 h de fermentação), T1



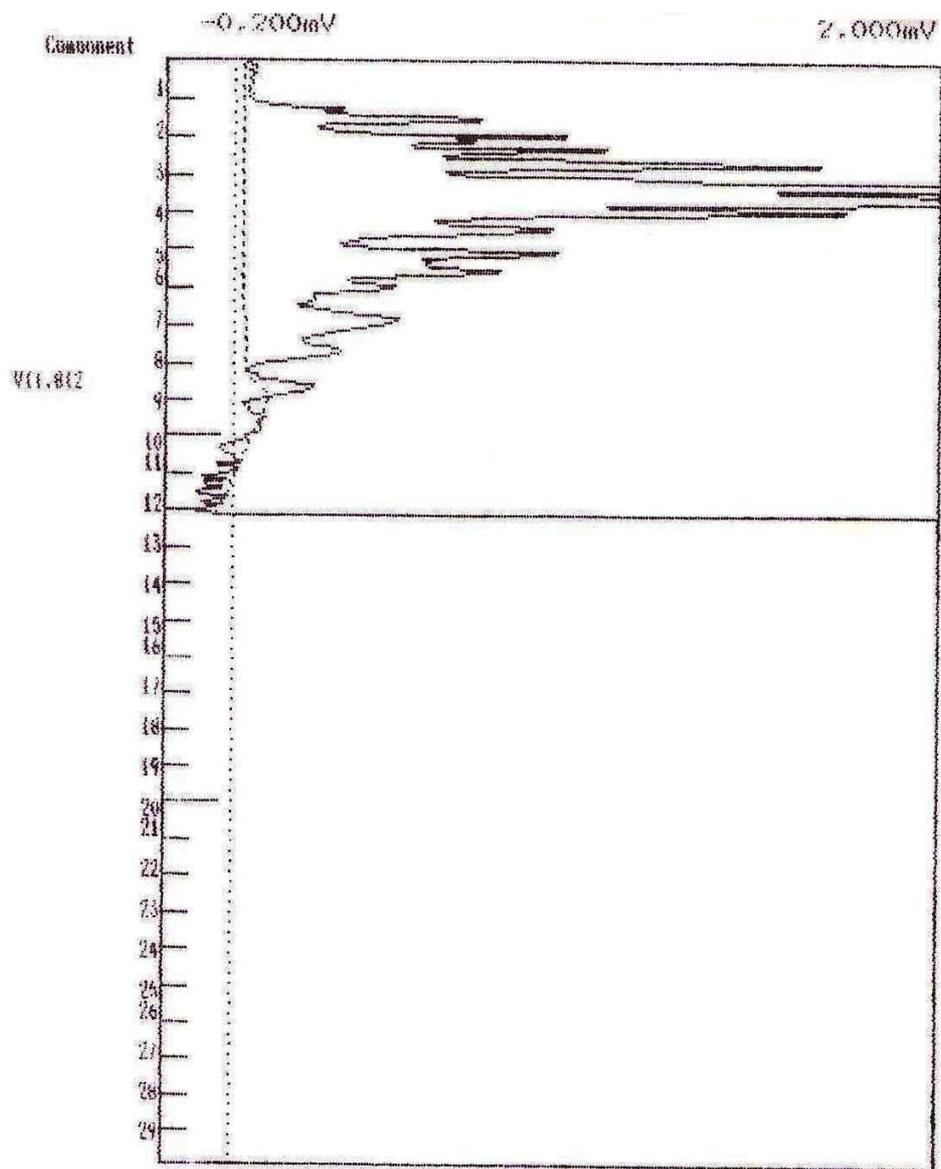
**FIGURA 3 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (6 h de fermentação), T2.



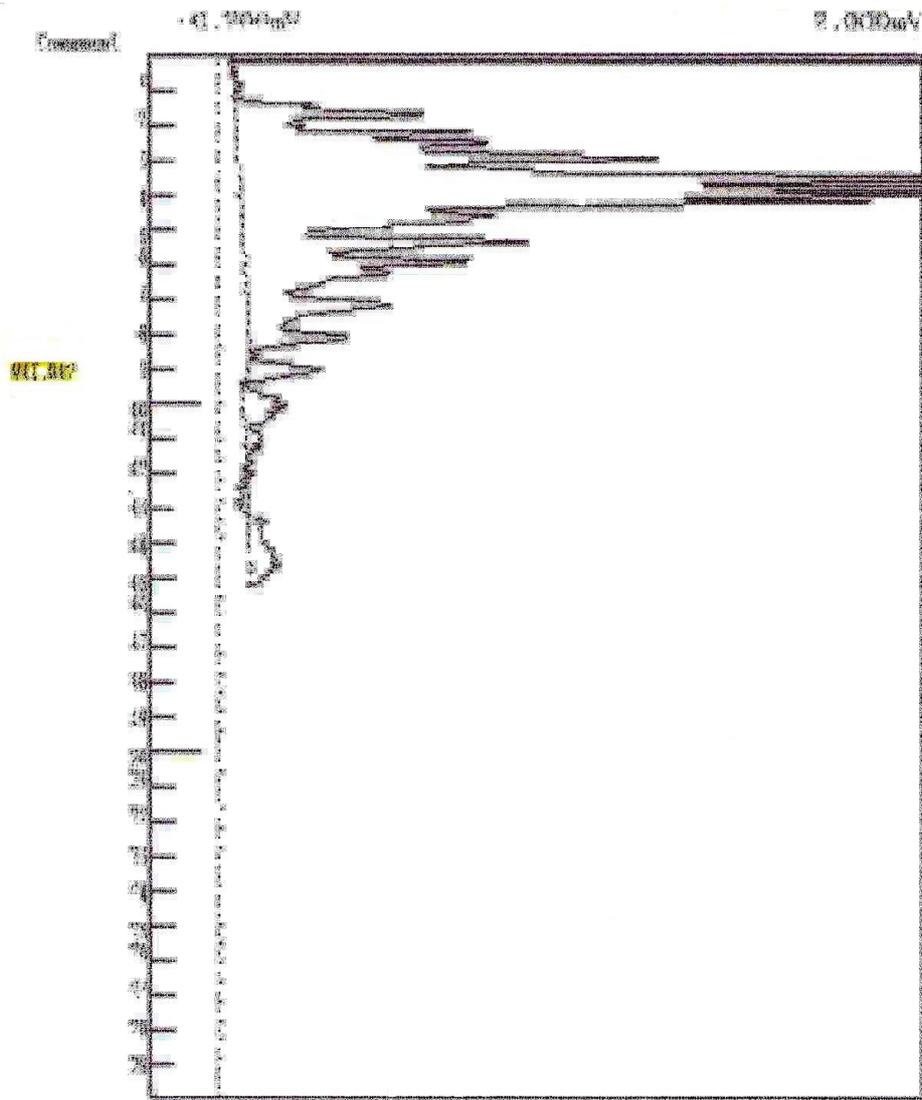
**FIGURA 4 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (6 h de fermentação), T3.



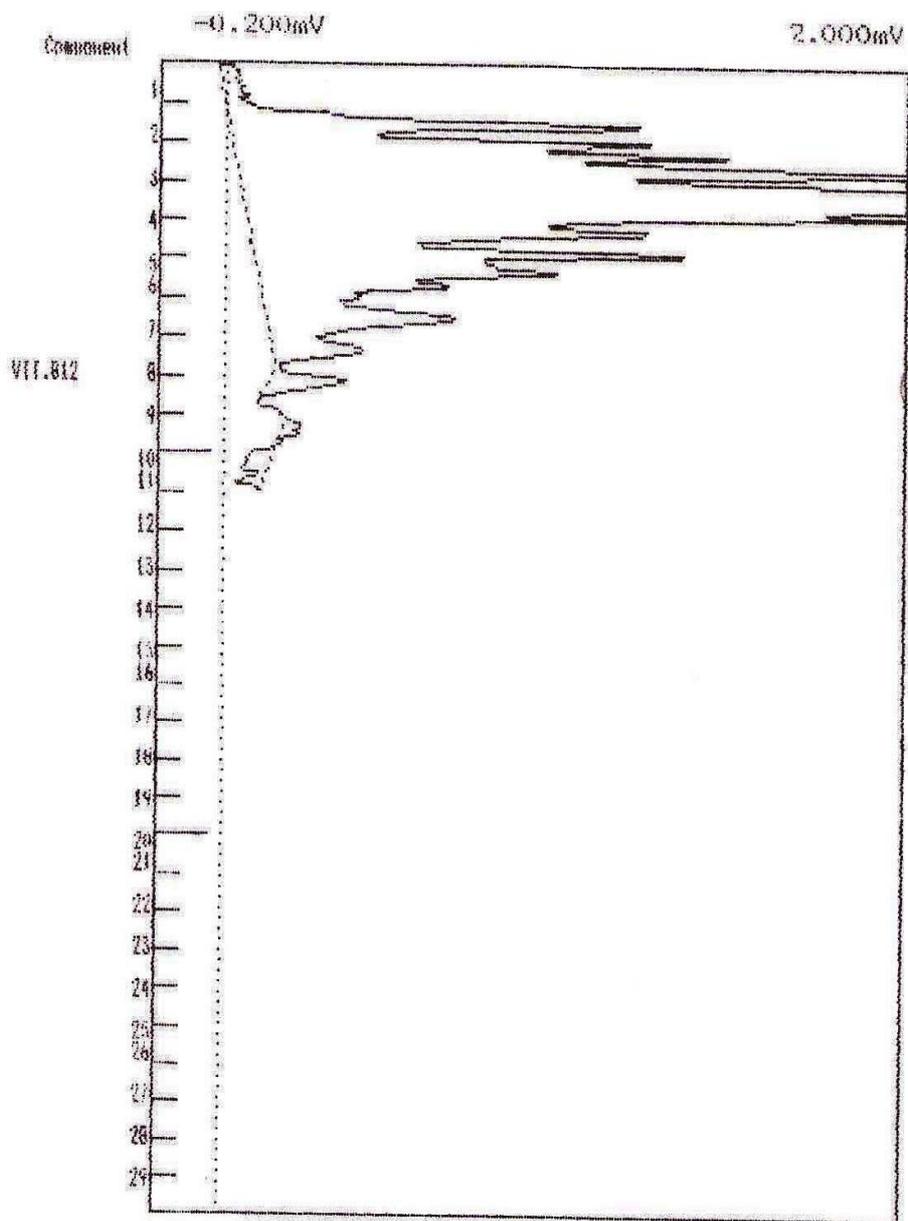
**FIGURA 5 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (6 h de fermentação), T4.



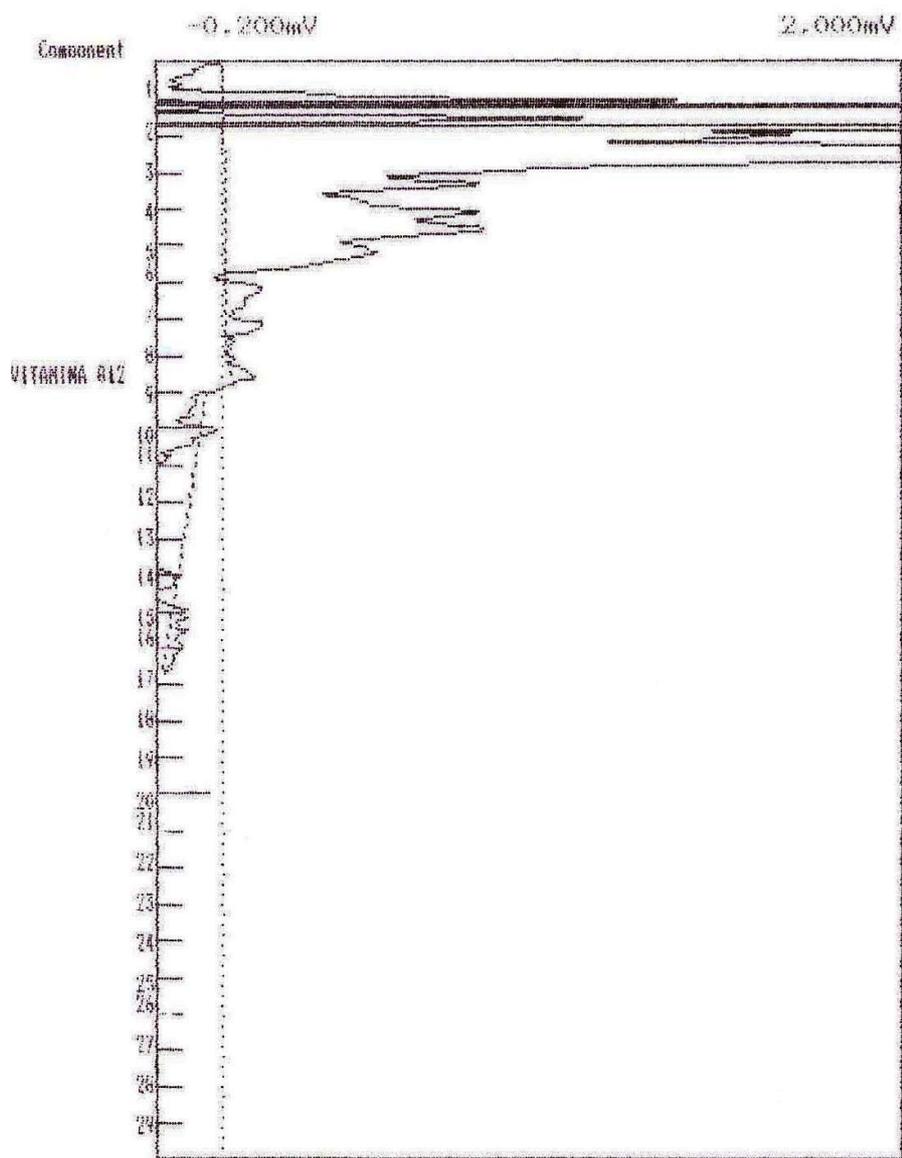
**FIGURA 6 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (6 h de fermentação), T5.



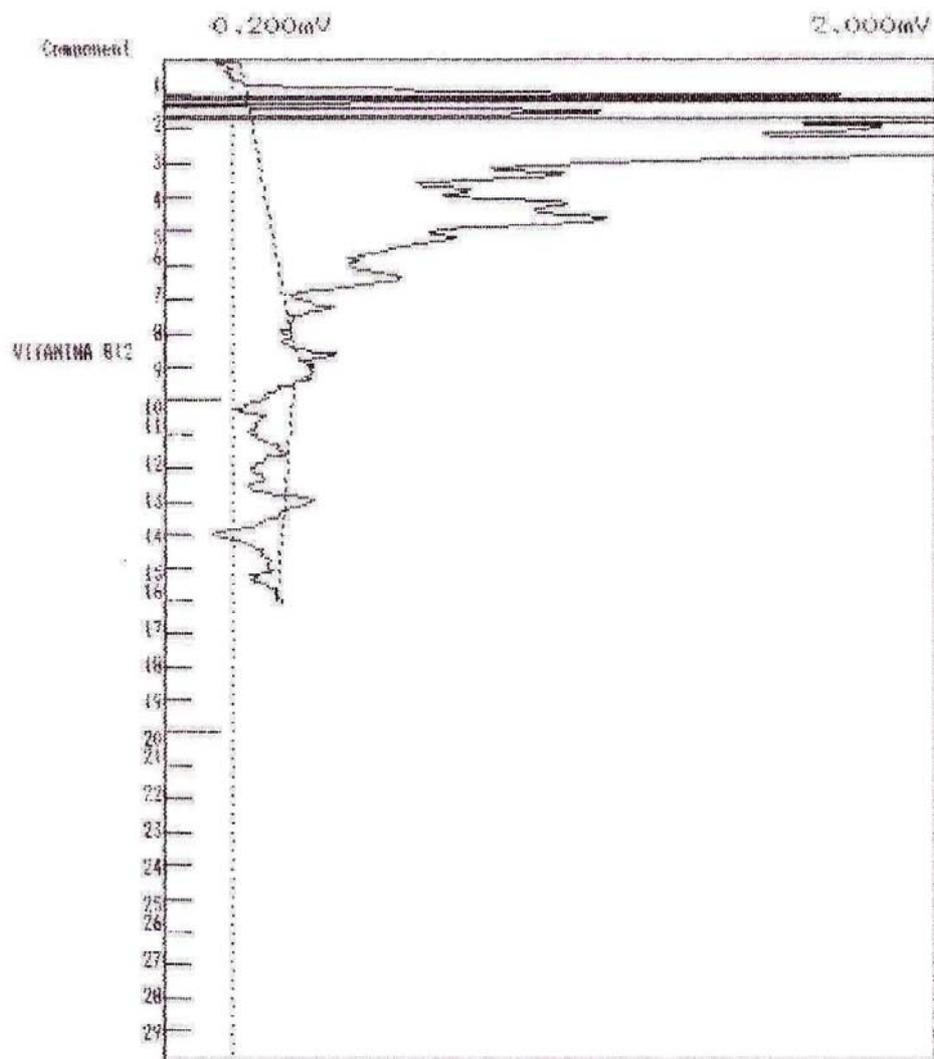
**FIGURA 7 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (3 h de fermentação).



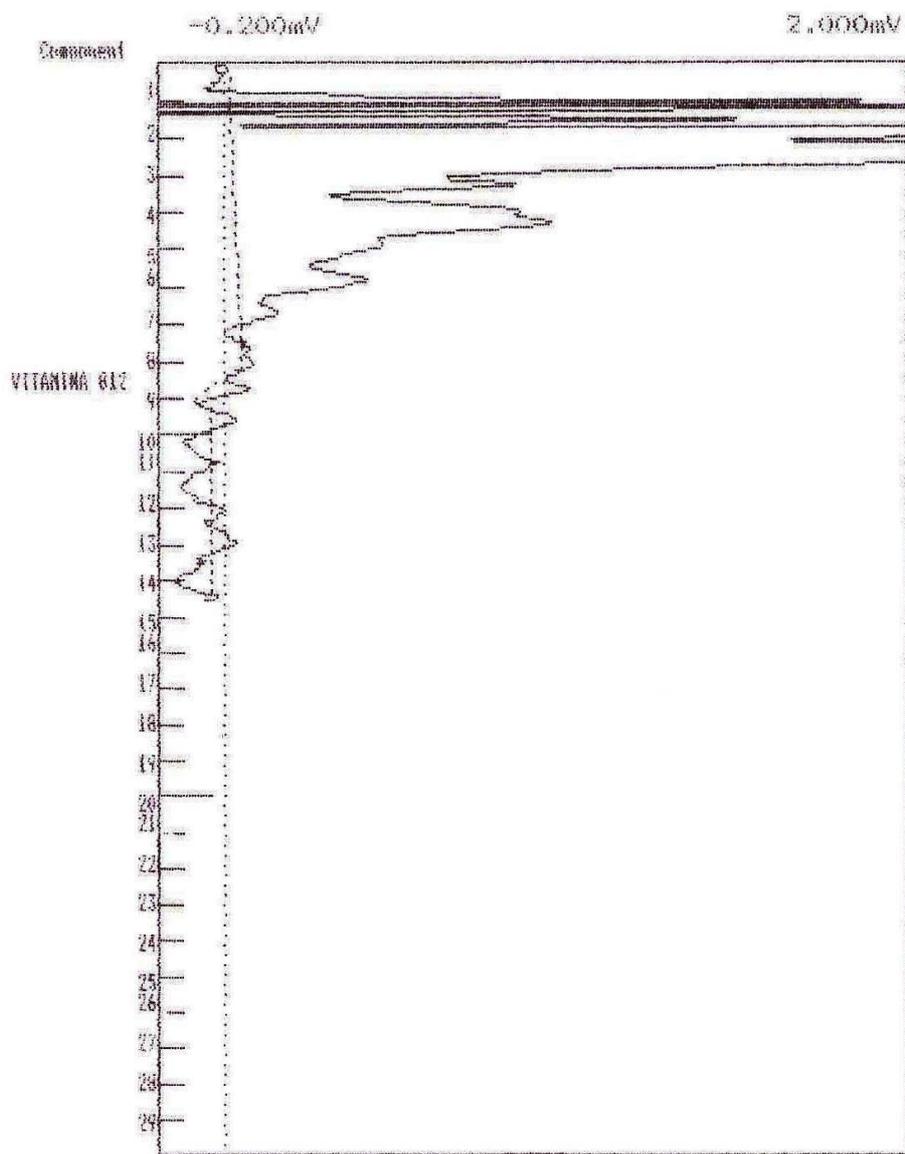
**FIGURA 8 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (4 h de fermentação).



**FIGURA 9 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> (5 h de fermentação).



**FIGURA 10 B**

Cromatograma de quantificação da vitamina B<sub>12</sub> no Kefir

