

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**NÉCTAR DE CUPUAÇU ADICIONADO DE PROTEÍNA DE SOJA E  
PROBIÓTICOS E AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS *IN VIVO* EM RATOS  
*Wistar* INDUZIDOS A LESÕES PRÉ NEOPLÁSICAS**

Ana Carla Alves Pelais

*Doctor Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

ANA CARLA ALVES PELAIS

**NÉCTAR DE CUPUAÇU ADICIONADO DE PROTEÍNA DE SOJA E  
PROBIÓTICOS E AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS *IN VIVO* EM RATOS  
*WISTAR* INDUZIDOS A LESÕES PRÉ NEOPLÁSICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa - Campus Viçosa

T

P381n Pelais, Ana Carla Alves, 1979-  
2014 Néctar de cupuaçu adicionado de proteína de soja e probióticos e  
avaliação de seus efeitos in vivo em ratos wistar induzidos a lesões pré  
neoplásicas / Ana Carla Alves Pelais. - Viçosa, MG, 2014.  
xiii, 102f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Afonso Mota Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cupuaçu. 2. Proteínas de soja. 3. Probióticos. 4. Lesão pré-  
neoplásica. 5. Ratos com animais de laboratórios. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-  
graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 634.65

ANA CARLA ALVES PELAIS

**NÉCTAR DE CUPUAÇU ADICIONADO DE PROTEÍNA DE SOJA E  
PROBIÓTICOS E AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS *IN VIVO* EM RATOS  
*Wistar* INDUZIDOS A LESÕES PRÉ NEOPLÁSICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de agosto de 2014.

---

Prof<sup>a</sup>. Erica Nascif Rufino Vieira

---

Prof<sup>a</sup>. Mirella Lima Binoti

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gouveia  
Peluzio  
(Coorientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Eliane Maurício Furtado  
Martins  
(Coorientadora)

---

Prof. Afonso Mota Ramos  
(Orientador)

*À minha Família.*

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa e Universidade do Estado do Pará, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao meu orientador pela orientação, ensinamentos, disponibilidade e principalmente pela confiança.

Aos colegas do Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças (DTA) pela agradável convivência e por sempre estarem dispostos em ajudar: Aline, Bianca (s), Daniele, Manuela, Marcela, Mônica, Patrícia, Erick, e em especial a Marcos, Ligia e Gabi (Gabriela Vilela), que me auxiliaram demasiadamente no processamento térmico das bebidas.

A Gabriela Vilela (DTA) e Silvia Lopes (DNS), pela dedicação e compromisso, no auxílio com os animais e nas incontáveis horas nas análises microscópicas.

Ao Eduardo do Departamento de Química/UFV, pelas análises cromatográficas.

A professora Hercia Stampini pela cessão do Laboratório de Nutrição Experimental (DNS) para o ensaio *in vivo*.

A OLVEBRA pela doação do extrato hidrossolúvel de soja.

A todos do Laboratório de Bioquímica Nutricional (LABIN/DNS), pela acolhida maravilhosa, estímulo e ajuda durante o ensaio *in vivo*. Ao Seu Toninho, pelo auxílio constante e imprescindível com os animais. Sandra, por me ensinar a técnica de gavagem. Solange e Manuela, pelo carinho, e desculpa por saírem as 23:00 horas do laboratório me ajudando a fazer extração de ácidos graxos de cadeia curta. Damiana, pelas contribuições desde o projeto de tese, planejamento da eutanásia e tratamentos dos resultados. E além desses, não poderia esquecer de Mariana, Luiz Fernando, Lisiane e Carlos que ajudaram na eutanásia.

A professora Maria do Carmo pelo conhecimento e apoio constantes pois, todo o período no LABIN, me proporcionaram um aprendizado acadêmico e de cooperação, que fizeram eu não desistir ou me arrepender de ter embarcado na pesquisa com animais.

A professora Eliane, pelas sugestões, apoio e interesse demonstrado para a realização desse trabalho.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, pelos ensinamentos compartilhados, críticas e sugestões. Em especial a Edimar Fontes e Erica Vieira, que participaram na defesa de projeto e qualificação.

Aos Funcionários do DTA, sempre dispostos a auxiliar no que fosse necessário. Em particular a Geralda e Pollyana, pela gentileza e serviços prestados.

Aos membros da banca examinadora do projeto, da qualificação e da tese pelas contribuições enriquecedoras.

Aos colegas de pós-graduação em Belém: Carissa, Ellen, Marilda, Silvana, e seu Inácio, pelo companheirismo nas longas horas de estudo enquanto fazíamos as disciplinas.

A turma (*do*) Belém do Pará em Viçosa, pela companhia, palavras, afeto e alegria constante, que minimizaram a dor de estar longe de casa. A Alessandra Eluan da Silva, pela amizade fraterna e ajuda fundamental nas análises físico-químicas, sensorial, gavagem, eutanásia, etc. Elaine, pelo amparo quando cheguei a Viçosa e imensa colaboração, quando realizei a avaliação sensorial, “catando” julgadores pela UFV. Adriano, Rose, Sérgio, Tonye e Vitória, por todos os momentos divertidos, nos encontros habituais na hora do almoço no R.U. falando, entre outras coisas, de nossa cidade, nossa comida, nossas famílias, enfim, aliviando a saudade de casa.

Ao Senhor de todas as coisas, por ter me dado forças para eu não desistir nos momentos difíceis e por ter colocado todas essas pessoas na minha jornada.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Alimentos Funcionais.....	3
1.1.2 A Soja .....	5
1.1.3 Cupuaçu .....	7
1.1.4 Produtos Probióticos não Lácteos .....	9
1.1.5 Epidemiologia e Etiologia do Câncer .....	10
1.1.6 Probióticos x Câncer Colorretal .....	12
1.1.7 Modelo Animal e Agente Carcinogênico.....	13
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>15</b>
<b>2. CAPÍTULO 1- DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE NÉCTAR A BASE DE CUPUAÇU E PROTEÍNA DE SOJA UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....</b>	<b>22</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
2.2.1 Caracterização da Polpa de Cupuaçu .....	26
2.2.2 Delineamento Experimental e Elaboração do Néctar .....	26
2.2.3 Avaliação Microbiológica .....	28
2.2.4 Avaliação Físico-química dos Néctares.....	28
2.2.5 Avaliação Sensorial .....	28
2.2.6 Análise Estatística .....	28
<b>2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Caracterização da Polpa de Cupuaçu .....	30
2.3.2 Estabilidade Microbiológica dos Néctares de Cupuaçu .....	31
2.3.3 Características Físico-químicas dos Néctares.....	32
2.3.4 Avaliação Sensorial dos Néctares de Cupuaçu .....	36
<b>2.4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>

<b>3. CAPÍTULO 2 - NÉCTAR DE CUPUAÇU E PROTEÍNA DE SOJA COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICOS: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, VIABILIDADE E RESISTÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO.....</b>	<b>44</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Delineamento Experimental.....	48
3.2.2 Preparo e Inoculação de Culturas Probióticas no Néctar de Cupuaçu e Proteína de Soja.....	48
3.2.3 Elaboração e Armazenamento do Néctar.....	48
3.2.4 Avaliação Físico-química e de Cor do Néctar.....	49
3.2.5 Determinação dos Ácidos Lático e Acético no Néctar .....	50
3.2.6 Viabilidade das Culturas Probióticas no Néctar .....	50
3.2.7 Resistência Gastrointestinal <i>in vitro</i> das Culturas Probióticas Adicionadas ao Néctar.....	50
3.2.8 Avaliação Sensorial dos Néctares .....	51
3.2.9 Análise Estatística .....	52
<b>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
3.3.1 Avaliação do pH, Acidez e Cor do Néctar.....	53
3.3.2 Ácidos Lático e Acético no Néctar .....	57
3.3.3 Viabilidade das Culturas Probióticas Durante 28 Dias de Armazenamento à 4 ± 1 °C.....	58
3.3.4 Sobrevivência das Culturas Probióticas em Condições Gastrointestinais <i>in vitro</i> .....	61
3.3.5 Aceitabilidade Sensorial dos Néctares .....	64
<b>3.4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>
<b>4. CAPÍTULO 3 - NÉCTAR DE CUPUAÇU E SOJA ADICIONADO DE PROBIÓTICO: EFEITOS <i>IN VIVO</i> EM RATOS <i>W1STAR</i> INDUZIDOS A LESÕES PRÉ NEOPLÁSICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>72</b>
<b>4.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
4.2.1. Animais e Tratamentos.....	75
4.2.2 Indução Química de Lesões Pré Neoplásicas .....	76
4.2.3 Quantificação e Categorização dos Focos de Criptas Aberrantes (FCA) .....	77
4.2.4 Determinação de Ácidos Graxos Voláteis nas Fezes .....	77
4.2.5 Determinação do pH Fecal.....	78

4.2.6	Quantificação de Microrganismos Fecais .....	78
4.2.7	Análises Bioquímicas.....	78
4.2.8	Índice Hepatosomático (IHS).....	79
4.2.9	Análise Estatística .....	79
<b>4.3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
4.3.1	Evolução da massa corporal de ratos <i>Wistar</i> induzidos a lesões pré neoplásicas.....	80
4.3.2	Número de FCA e quantificação de AGV em modelo animal da carcinogênese colorretal.....	81
4.3.3	Análise do pH e microbiota fecal de ratos <i>Wistar</i> induzidos a lesões pré neoplásicas.....	87
4.3.4	Efeito do néctar de cupuaçu e PS sobre os lipídeos sanguíneos e o Índice Hepatosomático de ratos <i>Wistar</i> .....	89
<b>4.4.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**FIGURA 1:** Foto ilustrativa do cupuaçu (a) e da polpa (b). .....8

### CAPÍTULO 1

**FIGURA 1:** Superfície de resposta e contorno do efeito da polpa de cupuaçu (%) e proteína de soja (g) sobre o pH (1A), acidez total titulável (1B) e teor de ácido ascórbico (1C) em néctar a base de cupuaçu e proteína de soja. ....34

**FIGURA 2:** Superfície de resposta e contorno do efeito da polpa de cupuaçu (%) e proteína de soja (g) sobre o sabor (2A), impressão global (2B) e intenção de compra (2C) em néctar a base de cupuaçu e proteína de soja. ....37

### CAPÍTULO 2

**FIGURA 1:** Variação do pH de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas. ....54

**FIGURA 2:** Variação da de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas. ....55

**FIGURA 3:** Variação das coordenadas L\* (A), a\* (B) e b\* (C) de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas e armazenados à  $4 \pm 1$  °C por 28 dias. ....56

**FIGURA 4:** Concentração dos ácidos láctico (a) e acético (b) em néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionado de culturas probióticas durante o armazenamento à  $4 \pm 1$  °C. Os resultados são médias de duas repetições  $\pm$  desvio padrão. ....58

**FIGURA 5:** Viabilidade das culturas probióticas nos néctares a base de cupuaçu e proteína de soja armazenados à  $4 \pm 1$  °C por 28 dias. ....59

### CAPÍTULO 3

**FIGURA 1:** Desenho experimental de ratos *Wistar* tratados com diferentes bebidas com e sem indução de lesões pré-neoplásicas. ....76

**FIGURA 2:** Ganho de massa corporal dos grupos avaliados durante o período experimental. ....80

**FIGURA 3:** Número médio de FCA no cólon de ratos *wistar* dos grupos experimentais após 10 semanas de tratamento, categorizados em  $\leq 3$  ou  $> 3$  FCA. ....82

**FIGURA 4:** Concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeia curta nas fezes dos animais dos grupos experimentais. ....86

**FIGURA 5:** Evolução do pH nas fezes do animais dos grupos experimentais. 88

**FIGURA 6:** Crescimento de *Lactobacillus* spp. (a) e *Bifidobacterium* spp. (b) em fezes dos animais, durante o período experimental. ....89

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**TABELA 1:** Caracterização físico-química em 100 g de polpa de cupuaçu. ....8

### CAPÍTULO 1

**TABELA 1:** Matriz do planejamento experimental usando Compósito Central sobre as variáveis independentes polpa de cupuaçu (%) e teor de proteínas para a otimização da formulação do néctar tendo como resposta a aceitação sensorial e a intenção de compra. ....27

**TABELA 2:** Médias da contagem do número mais provável de coliformes a 35 °C e a 45 °C (NMP/50 mL) e de Salmonella (presença/ausência em 25 mL) nos néctares de cupuaçu. ....31

**TABELA 3:** Delineamento experimental usado para a elaboração do néctar e suas características físico-químicas e sensoriais. ....33

**TABELA 4:** Modelos ajustados para as respostas pH, ATT e AA em função da polpa de cupuaçu (C) e proteína de soja (S) e respectivos coeficientes de determinação. ....35

**TABELA 5:** Modelos ajustados para as respostas sabor, impressão global e intenção de compra em função da polpa de cupuaçu (C) e proteína de soja (S) e respectivos coeficientes de determinação. ....38

### CAPÍTULO 2

**TABELA 1:** Valores médios de pH e acidez de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas. ....53

**TABELA 2:** Resultados médios dos parâmetros de cor em néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas. ....55

**TABELA 4:** Sobrevivência das culturas probióticas ( $\text{Log}_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>) em néctar a base de cupuaçu e proteína de soja, submetidas a resistência gastrointestinal in vitro, durante o período de armazenamento à  $4 \pm 1$  °C. ....61

**TABELA 5:** Médias de escores para a o teste de aceitação nos néctares. ....64

### CAPÍTULO 3

**TABELA 1:** Número total de FCA e por região (distal, medial e proximal) do cólon de ratos Wistar dos grupos experimentais após 10 semanas de tratamento. ....84

**TABELA 2:** Concentrações séricas de Triglicerídeos, Colesterol Total, LDL e HDL e Índice Hepatossomático de ratos Wistar submetidos aos diferentes tratamentos com néctar probiótico de cupuaçu e PS. ....90

## RESUMO

PELAIS, Ana Carla Alves. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Néctar de cupuaçu adicionado de proteína de soja e probióticos e avaliação de seus efeitos *in vivo* em ratos Wistar induzidos a lesões pré neoplásicas.** Orientador: Afonso Mota Ramos. Coorientadores: Eliane Maurício Furtado Martins e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

A viabilidade da utilização de microrganismos probióticos em matrizes não lácteas como néctares e sucos de frutas tem sido avaliada com sucesso por muitos pesquisadores. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um néctar a base de polpa de cupuaçu (18,5 %, 20 %, 30 %, 40 % e 41,5 %) e proteína de soja (0,7 g, 1 g, 1,75 g, 2,5 g e 2,8 g) adicionado de probiótico e avaliação de seus efeitos *in vivo* em ratos *Wistar* induzidos a lesões pré neoplásicas. Na formulação mais aceita (20 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja), adicionou-se *L. acidophilus* LA-3 (T<sub>1</sub>), *L. paracasei* BGP1 (T<sub>2</sub>) e a mistura *L. acidophilus* LA-3 / *L. paracasei* BGP1 (T<sub>3</sub>), resultando em três tratamentos, além do controle sem probiótico. Foram realizadas análises físico-químicas, microbiológicas e avaliação sensorial nos diversos ensaios dos néctares e a partir da formulação otimizada, fez-se o acompanhamento da bebida durante 28 dias de armazenamento a 4 °C por meio das características físico-químicas, viabilidade probiótica e resistência *in vitro* as condições gastrointestinais. Concomitantemente, as bebidas foram administradas em grupos de ratos *Wistar*, via gavagem, na quantidade de 3 mL/kg de peso/dia, durante um período de 10 semanas. Como agente indutor da lesão pré neoplásica de cólon foi utilizada a 1,2-dimetilhidrazina. Durante o período experimental, coletou-se as fezes frescas dos animais para as determinações do pH e *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Ao final do experimento, após a eutanásia, amostras de sangue, fezes do ceco, fígado e o cólon foram preparadas para as determinações séricas, de ácidos graxos voláteis, índice hepatossomático e quantificação de Focos de Criptas Aberrantes (FCA). Os resultados mostraram que os néctares elaborados apresentaram-se dentro dos padrões microbiológicos preconizados pela legislação vigente. Em relação aos parâmetros físico-químicos observou-se que o aumento da concentração de polpa de cupuaçu provocou um incremento linear na acidez total titulável e no teor de ácido ascórbico e conseqüentemente reduziu o valor de pH. Os néctares tiveram boa aceitabilidade sensorial, com escores médios acima de

5,0 para os atributos sabor e impressão global e acima de 2,0 para a intenção de compra. A partir das superfícies obtidas sugeriu-se o ensaio com 20 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja, como a melhor formulação, na qual foram adicionadas as culturas probióticas. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para os parâmetros de cor avaliados. Embora tenha sido observado um aumento da acidez e a diminuição do pH durante as quatro semanas de armazenamento, a viabilidade das culturas utilizadas foi mantida em pelo menos  $7,0 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  em todos os néctares por todo o período de armazenamento. O néctar  $T_1$  apresentou a menor sobrevivência ao final da simulação gastrointestinal *in vitro* com  $3,35 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ , enquanto  $T_2$  e  $T_3$ , foram mais tolerantes ao estresse com contagens de 6,13 e  $5,35 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ , respectivamente. Na avaliação sensorial, os tratamentos controle e  $T_1$  tiveram a melhor aceitação, possivelmente em decorrência da menor acidez apresentada. No ensaio *in vivo*, os resultados sugerem que a ingestão do néctar probiótico não exerceu efeito protetor na formação de FCA em todos os grupos avaliados. Os ácidos graxos voláteis também não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos alimentados com a bebida. O pH fecal reduziu apenas a partir da sétima semana do período experimental, enquanto que, a contagem de *Lactobacillus* ssp. e *Bifidobacterium* ssp. não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais durante o período avaliado. O colesterol total, HDL e o LDL não diferiram ( $p > 0,05$ ) nos grupos alimentados com a bebida em relação aos grupos controle. Pode-se atribuir o efeito não significativo da bebida nos parâmetros avaliados nos animais tratados com a DMH, possivelmente, à duração do experimento.

## ABSTRACT

PELAIS, Ana Carla Alves. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2014. **Cupuassu nectar added soy protein and probiotics and evaluation of their effects *in vivo* on Wistar rats induced to pre neoplastic lesions.** Adviser: Afonso Mota Ramos. Co-advisers: Eliane Maurício Furtado Martins and Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

The viability of using probiotic microorganisms in non-dairy matrices as nectars and fruit juices has been successfully evaluated by many researchers. Thus, this work aimed to develop a nectar based on cupuassu pulp (18.5 %, 20 %, 30 %, 40 %, and 41.5 %) and soybean protein (0.7 g, 1 g, 1.75 g, 2.5 g, and 2.8 g) containing probiotic with evaluation of their effects *in vivo* on *Wistar* rats induced to pre-neoplastic lesions. In the best formulation, *L. acidophilus* LA-3 (T<sub>1</sub>), *L. paracasei* BGP1 (T<sub>2</sub>), and the *L. acidophilus* LA-3/*L. paracasei* BGP1 (T<sub>3</sub>) mixture were added resulting in three treatments in addition to control without probiotic. Physicochemical analysis, microbiological, and sensory evaluation were performed in the various trials of nectar; based on the optimized formulation, the monitoring of the beverage was made for 28 days of storage at 4 °C by means of physicochemical characteristics, probiotic viability, and *in vitro* resistance to the gastrointestinal conditions. Concomitantly, the beverages were administered to *Wistar* rats groups by gavage at a rate of 3 mL/kg body weight/day for a period of 10 weeks. As inducing agent of the colon pre-neoplastic lesions, 1.2 – dimethylhydrazine (DMH) was used. During the experimental period, fresh feces were collected from animals for determining pH, *Lactobacillus* spp., and *Bifidobacterium* spp. At the end of the experiment after euthanasia, samples of blood, cecum's feces, liver, and colon were prepared to determine serum, volatile fatty acids, and hepatosomatic index, and for quantification of Aberrant Crypt Foci (ACF). Results showed that the prepared nectars were according to the recommended microbiological standards of the current law. In relation to the physicochemical standards, it was observed that increasing the concentration of cupuassu pulp caused a linear increase in titratable acidity and ascorbic acid content and consequently reduced the pH value. Nectars had good sensory acceptability, with mean scores above 5.0 for flavor attributes and overall impression and above 2.0 for the purchasing behavior. Based on obtained results, testing at 20% of cupuassu pulp and 2.5 g of soy protein were suggested as the best formulation, in which

probiotic cultures were added. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) among treatments for evaluated color parameters. Although acidity increase and pH reduction during the four storage weeks were observed, the viability of the used cultures was maintained in at least  $7.0 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  in all nectars throughout the storage period. The  $T_1$  nectar showed the lowest survival at the end of the *in vitro* gastrointestinal simulation with  $3.35 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ , while  $T_2$  and  $T_3$  were more tolerant to stress with scores of  $6.13$  and  $5.35 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ , respectively. In sensory evaluation, control and  $T_1$  treatments had the best acceptance, possibly due to the lower presented acidity. On *in vivo* assay, results suggest that ingestion of probiotic nectar did not exert a protective effect on the formation of ACF in all evaluated groups. Volatile fatty acids also showed no difference ( $p > 0.05$ ) among the groups fed with the beverage. Fecal pH decreased only from the seventh week of the experimental period, while the count of *Lactobacillus* ssp. and *Bifidobacterium* spp. showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) among the experimental groups during the studied period. total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), and low density lipoprotein (LDL) did not differ ( $p > 0.05$ ) in the groups fed with the beverage compared to the control groups. The no significant effect of the beverage at the evaluated parameters in animals treated with dimetilhidrazina (DMH) can be possibly attributed to the experiment duration.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O consumo de bebidas não alcoólicas aumentou em todo o Brasil de acordo com estudo realizado pela consultoria Canadean para a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e bebidas não alcoólicas (ABIR). As bebidas prontas pra consumo como refrescos, néctares, bebidas a base de soja, isotônicos e energéticos, foram as principais responsáveis pelo aumento observado (ABIR, 2011). Ao mesmo tempo, os consumidores estão mais conscientes e preocupados com seu estilo de vida, o que aumentou a demanda por os alimentos que promovem a saúde e bem-estar, tais como produtos funcionais contendo microrganismos probióticos (MARTINS et al., 2013).

A maioria dos produtos probióticos disponíveis no mercado são de base láctea como leites fermentados(KAILASAPATHY, 2006) iogurtes (HOMAYOUNI et al., 2008) sorvetes (SANCHEZ et al., 2009) e queijos (FRITZEN-FREIRE MULLER; LAURINDO; PRUDENCIO, 2010), havendo um crescente interesse na elaboração de bebidas não lácteas contendo probióticos, principalmente devido ao grande número de pessoas intolerantes à lactose ou que necessitam de dietas com restrição de colesterol (MARTINS et al., 2013). Entre os alimentos não lácteos pesquisados como veículos para os probióticos estão os sucos e néctares de fruta (SHEEHAN; ROOS; FITZGERALD, 2007; CHAMPAGNE; GARDNER, 2008; NICOLESCO; BURULEANU, 2010; SAW et al., 2011; ANTUNES et al., 2013).

Na Região Amazônica existem espécies de fruteiras domesticadas ou cultivadas com grande potencial agroindustrial e ainda pouco exploradas. Dentre essas espécies destaca-se o cupuaçuero (*Theobroma grandiflorum Schum*) o qual possui um fruto que apresenta polpa com características ideais para o aproveitamento industrial (COSTA et al., 2003), sendo utilizada no preparo sorvetes, sucos, geléias e diversas sobremesas, processados de forma artesanal, ou seja, em pequena escala de produção (COHEN; JACKIX, 2005).

Apesar da variedade de frutas tropicais com sabores exóticos bastante agradáveis, as bebidas contendo extrato de soja tornaram-se bastante populares e vêm sendo avaliadas como veículos para probióticos. Os efeitos do sinergismo entre os probióticos e produtos da soja sugerem que essa combinação pode exercer efeitos benéficos, uma vez que a soja contém

oligossacarídeos naturais como a rafinose e estaquiose, considerados como prebióticos e que estimulam o crescimento de probióticos (KARR-LILIENTHAL, et al., 2005; WOO et al., 2009).

Os probióticos são caracterizados por gêneros, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., e entre os principais efeitos atribuídos ao consumo de probióticos estão: a manutenção do balanço da microbiota intestinal, o antagonismo do crescimento de patógenos, o estímulo do sistema imunológico e a redução da intolerância à lactose, que beneficiam a saúde aumentando a proteção contra infecções intestinais e a prevenção de diversas doenças como o câncer de cólon (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

O câncer de cólon é uma patologia que se caracteriza por um crescimento desordenado de uma população de células que escapam da regulação normal de crescimento, replicação e diferenciação (WISEMAN, 2011). Inicialmente, pode apresentar-se como alterações microscópicas discretas da mucosa, denominadas focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré neoplásicas (BIRD, 1987; BIRD, 1995). O número total e ao tamanho dos FCA podem ser determinados de forma simples, rápida e econômica, e sua avaliação constitui um bioensaio de curto prazo para avaliar o emprego de agentes quimiopreventivos na carcinogênese colorretal (NEWELL; HEDDLE, 2004).

Assim, diante da procura dos consumidores por alimentos mais saudáveis, capazes de trazer benefícios extras à saúde, e dos potenciais efeitos benéficos da soja e dos probióticos, este trabalho tem como objetivo elaborar um néctar a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de probióticos e avaliar seus efeitos *in vivo* em ratos *wistar* induzidos à lesões pré-neoplásicas.

## **1.1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1.1 Alimentos Funcionais**

De acordo Brasil (1999), alimento funcional é "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". Entre esses alimentos funcionais estão aqueles contendo probióticos e prebióticos.

O termo "probiótico" foi usado pela primeira vez pelos veterinários Lilly e Stillwel em 1965 para denominar substâncias secretadas por microrganismos que estimulavam a multiplicação de outros microrganismos. Fuller (1989) redefiniu o termo para "organismos vivos que quando ingeridos exercem efeito benéfico no balanço da microbiota intestinal do hospedeiro".

Outras definições foram publicadas a partir daí, porém, a mais aceita internacionalmente é a de que os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

No momento do seu consumo, os probióticos devem estar viáveis nos alimentos e manter sua viabilidade após contato com ácido gástrico e com sais biliares (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Após vencerem essa barreira química, os probióticos aderem a superfície intestinal, onde desempenham influência benéfica como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos, devido a estimulação da multiplicação de bactérias benéficas em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). No entanto, a manutenção destas populações está intimamente relacionada com o tipo de alimento consumido pelo indivíduo.

Os probióticos são fornecidos por alimentos processados ou por suplementos dietéticos contendo bactérias vivas. Queijo, leites fermentados, sucos e fórmulas infantis também são veículos de probióticos. Os principais produtos fermentados disponíveis no mercado utilizam lactobacilos, estreptococos e bifidobactérias que são os constituintes normalmente encontrados na microbiota gastrointestinal humana (DAVIS; MILNER, 2009).

Bebidas de frutas também podem ser utilizadas como veículo de probióticos. Champagne; Gardner (2008) avaliaram a capacidade de estirpes de lactobacilos sobreviverem em sucos prontos para beber, armazenados a 4°C durante 80 dias. O pH da bebida foi 4,2, o que permitiu uma boa estabilidade das culturas durante o armazenamento. Quatro estirpes foram selecionadas para verificar suas resistências em um simulador de condições gastrointestinais. Comparando culturas recém adicionadas ao suco com culturas que se apresentavam à 4 °C durante 35 dias, constatou-se que o armazenamento refrigerado não afetou a viabilidade na presença de sais biliares a 0,3% ou de enzimas pancreáticas.

Com o objetivo de assegurar que os alimentos probióticos disponíveis no mercado possuam de fato viabilidade no intestino humano, a ANVISA (BRASIL, 2008) determina que a quantidade mínima viável de probióticos deve estar na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) na recomendação diária do produto pronto para consumo.

Para que os probióticos possam ter sua atividade otimizada no organismo humano, é necessário que haja nutrientes para seu crescimento e reprodução, sendo o colón o local onde estas bactérias encontram os substratos ideais. Estes incluem todos os alimentos ingeridos que não foram absorvidos e que ultrapassam a válvula ileocecal, principalmente os prebióticos (DAVIDSON; CARVALHO, 2007).

O termo prebiótico refere-se a componentes não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimularem seletivamente a multiplicação ou atividade de bactérias desejáveis no colón, podendo ainda atuar na inibição da multiplicação de patógenos. Estes componentes alimentares atuam mais frequentemente no intestino grosso, no entanto, podem ter ação sobre os microrganismos no intestino delgado (SAAD, 2006; FERREIRA; SILVA, 2010).

Neste contexto, os carboidratos não digeríveis como a inulina, a lactulose e diversos oligossacarídeos, estão entre os componentes que proporcionam efeito positivo na composição da microbiota intestinal quando consumidos associados a microrganismos probióticos, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacteria* spp. (FOOKS; GIBSON, 2002; SAAD, 2006).

Os prebióticos estimulam o crescimento de bactérias benéficas no intestino grosso, modificando favoravelmente a composição da microbiota intestinal e aumentando a atividade metabólica destas bactérias. Os prebióticos atuam ainda alterando o trânsito intestinal, reduzindo metabólitos tóxicos, prevenindo a diarreia e a obstipação (SAAD, 2006).

Os produtos finais da fermentação de substâncias prebióticas (ácido láctico e os ácidos graxos de cadeia curta, em especial o acético, propiônico e butírico) são responsáveis pela redução do pH no intestino grosso. Esta redução promove o aumento de bactérias benéficas, por serem resistentes em meio ácido, ao passo que as bactérias patogênicas, sensíveis a acidez, tem seu número diminuído. As bactérias benéficas produzem e secretam bacteriocinas, substâncias antibacterianas que exercem efeito sobre a microbiota patogênica (MELO, 2004).

A combinação de culturas probióticas com ingredientes prebióticos resulta nos alimentos simbióticos (CAPRILES; SILVA; FISBERG, 2005). A interação entre estes *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo humano. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico. Alternativamente esse efeito simbiótico pode ser direcionado às regiões “alvo” do trato gastrodigestório (PEIXOTO; SILVA, 2008).

### **1.1.2 A Soja**

A soja é no Brasil um dos principais itens da produção agrícola, que movimentou na cadeia produtiva do agronegócio, no ano de 2012, cinquenta bilhões de dólares (IBGE, 2012). No contexto mundial, o Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor do grão, entretanto o principal diferencial em relação aos Estados Unidos e à Argentina, primeiro e terceiro colocados, está na disponibilidade de uma maior área potencial para expansão do cultivo. Especialistas projetam uma produção superior à 105 milhões de toneladas em 2020, o que tornaria o país o principal produtor do grão (FREITAS, 2011).

O consumo da soja (*Glycine max*) processada na forma de derivados despertou o interesse da população e, principalmente dos pesquisadores, não só por ser considerada uma fonte importante de nutrientes de baixo custo, mas

por sua associação a múltiplos efeitos que melhoram a saúde, mediados por seus componentes bioativos, como as isoflavonas que são substâncias envolvidas em atividades anti-carcinogênicas, na redução de perda de massa óssea e na diminuição do colesterol do sanguíneo (BARNES et al., 2006).

Apesar de todos os benefícios da soja, seu consumo ainda encontra rejeição. A aceitabilidade do extrato hidrossolúvel de soja pelo consumidor é limitada por apresentar características sensoriais semelhantes às do feijão cru, devido a presença de compostos voláteis de baixa massa molecular que são produtos da ação das lipoxigenases, que por sua vez, podem ser inativadas por meio de tratamento térmico adequado. Além disso, o extrato apresenta um sabor característico de soja e um alto teor de oligossacarídeos como a rafinose e estaquiase, responsáveis pelos fatores de flatulência que limitam seu consumo (OLIVEIRA et al., 2010).

Os produtos da soja vêm sendo avaliados como veículos de culturas probióticas (GRANATO et al., 2010; ULIANA; VENTURINI FILHO; ULIANA, 2012). Os efeitos sinérgicos entre os probióticos e produtos de soja sugerem que essa combinação pode exercer efeitos funcionais (WOO et al., 2009). A presença de fatores bifidogênicos no extrato de soja, como os oligossacarídeos rafinose e estaquiase, assim, como outros açúcares (sacarose, frutose, glicose, galactose), vitaminas do complexo B e fontes de nitrogênio das proteínas da soja, fazem do extrato hidrossolúvel de soja um meio complexo e ótimo substrato para crescimento dos probióticos (CHOU; HOU, 2000).

### 1.1.3 Cupuaçu

A produção mundial de frutas tem apresentado um crescimento contínuo, sendo a China, a Índia e o Brasil, os três maiores produtores, que juntos, somam 42,3% do total mundial e têm suas produções destinadas principalmente ao mercado interno (ANDRADE, 2011).

No Brasil, além da laranja, principal fruta produzida com 18,1 milhões de toneladas em 2010, que responde por 42,9% do volume total da Fruticultura, seguido da banana com 7,0 milhões de toneladas, que correspondentes a 16,5% do volume das frutas (ANDRADE, 2011), existe uma grande variedade de frutas de clima tanto tropical quanto temperado.

Entre as culturas de clima tropical, tem-se o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), que pertence à família *Sterculacea*. É uma planta típica da floresta amazônica, encontrada no estado silvestre ou cultivada, disseminada por toda a região Norte (COSTA et al., 2003). Seu fruto destaca-se como um dos principais produzidos na região amazônica, pois apresenta intensa divulgação no território brasileiro e tem potencial para a industrialização de seus derivados (CARVALHO; PEZOA GARCÍA; FARFÁN, 2008). Segundo Bastos et al. (2002) a cultura do cupuaçuzeiro cresceu em muitas áreas da Amazônia brasileira devido ao aumento na demanda de polpa, bastante apreciada pela população.

O fruto é o maior do gênero *Theobroma* com característica de baga drupácea, elipsoidea ou oblonga, tendo as extremidades obtusas ou arredondadas, com comprimento entre 12 e 25 cm e diâmetro de 10 a 12 cm, pesando de 500 a 2500 g (Figura 1a) (LANNES, 2003).



**FIGURA 1:** Foto ilustrativa do cupuaçu (a) e da polpa (b).

O endocarpo ou polpa (Figura 1b) de coloração amarela-clara é ácida e de sabor exótico, possui aroma intenso e agradável, pois é rico em compostos voláteis (FRANCO; SHIBAMOTO, 2000), além de alto valor nutricional, onde é notada a presença de vitamina C e de minerais como o fósforo e potássio (Tabela 1).

**TABELA 1:** Caracterização físico-química em 100 g de polpa de cupuaçu.

Determinações	Araujo (2007)	Freire et al. (2009)	TACO (2011)
Umidade (%)	87,1	90,30	86,20
Proteínas (%)	1,71	0,75	1,2
Lipídios (%)	0,63	0,96	1,0
Cinzas Totais (%)	0,82	0,72	1,2
Fibra alimentar (%)	nd	nd	3,1
Sólidos Solúveis Totais	13,6	9,09	nd
Acidez (% ácido cítrico)	2,7	1,61	nd
pH	3,58	3,45	nd
Ácido Ascórbico(mg)	nd	2,65	24,5
Fósforo (mg)	nd	nd	331
Potássio (mg)	nd	nd	21

nd- não determinado.

Devido ao seu sabor ácido, a polpa dos frutos não é normalmente consumida sozinha, mas é utilizada na fabricação de bebidas (“vinho do cupuaçu” e suco), sorvetes, licores, geleias, conservas e doces (BASTOS et al., 2002; YANG et al., 2003).

Em relação aos compostos voláteis, segundo Boulanger; Crouzet (2000 *apud* ROGEZ et al., 2004), os principais compostos relacionados ao aroma floral do cupuaçu são o linalol,  $\alpha$ -terpinol, 2-feniletanol, mirceno e linoleno. Em relação ao aroma exótico típico do cupuaçu, os autores sugerem que estejam relacionados os dióis e o metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furano. Quijano; Pino (2007), também encontraram o linalol entre os principais componentes aromáticos na polpa de cupuaçu.

O cupuaçu é um dos mais importantes frutos tropicais tipicamente amazônicos com um grande potencial econômico. No primeiro semestre de 2005, o Brasil exportou 50 mil toneladas de polpa para outros países (MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, 2007). A demanda crescente para o fruto, especialmente para a sua polpa, demonstra a necessidade de novas pesquisas que utilizem esta matéria prima.

#### **1.1.4 Produtos Probióticos não Lácteos**

Os probióticos são utilizados principalmente na produção de leites fermentados (SANCHEZ et al., 2009) e outros produtos lácteos, como iogurte (KAILASAPATHY, 2006), sorvete (HOMAYOUNI et al., 2008), queijo (FRITZEN-FREIRE MULLER; LAURINDO; PRUDENCIO, 2010), e em menor quantidade para carnes, cereais, legumes e frutas (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008; MARTINS et al., 2013).

Outros alimentos não lácteos que podem ser usados como veículos para os probióticos são os sucos de fruta. Estes são adequados para os consumidores que são intolerantes à lactose (PRADO et al., 2008.), e além disso, contêm grandes quantidades de açúcares, fundamentais para a sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento (DING; SHAH, 2008). Embora exista escassez de informação disponível sobre os fatores que influenciam a sobrevivência dos probióticos nos sucos de frutas comparado aos produtos lácteos, a maioria dos parâmetros prováveis incluem as espécies utilizadas (KAILASAPATHY; HARMSTORF; PHILIPS, 2008), o método de preparação das culturas (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008), a composição do produto (SHAH, 2000), a temperatura e o tempo de armazenamento (SAARELA et al., 2006a), a presença de fibra dietética no produto (SAARELA

et al., 2006b), os níveis de oxigênio (SHAH, 2000), e o tipo de embalagem (CHAMPAGNE; RAYMOND; GAGNON, 2008).

### **1.1.5 Epidemiologia e Etiologia do Câncer**

O câncer é uma patologia que se caracteriza por um crescimento desordenado de uma população de células que escapam da regulação normal de crescimento, replicação e diferenciação e que possuem a capacidade de invadir tecidos circundantes ou distantes. Essencialmente, as neoplasias resultam da função celular anormal, sendo estas anormalidades decorrentes de alterações na estrutura nucleotídica do DNA (WISEMAN, 2011).

O câncer colorretal (CCR) origina-se primariamente de pólipos colorretais, que são projeções ou elevações da superfície da mucosa colorretal. Dividem-se de acordo com a sua histologia em: neoplásicos, hamartomatosos, inflamatórios e hiperplásicos. Estas alterações no epitélio colônico conhecidas como lesões benignas, evoluem para lesões malignas, denominados adenocarcinomas (BODGER, 2000; ROSSI et al., 2004).

Em relação ao CCR, a estimativa para novos casos no Brasil, para o ano de 2014, são de 15.070 em homens e 17.530 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 17 a cada 100 mil mulheres. A nível mundial, o CCR é o terceiro tipo de câncer mais comum entre homens e o segundo entre o sexo feminino (INCA, 2014).

Este tipo de neoplasia é considerado de bom prognóstico quando diagnosticada em estágios iniciais. A sobrevida média global em 5 anos se encontra em 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. De igual modo a incidência, as taxas de mortalidade são mais baixas em mulheres do que em homens (INCA, 2014).

A etiologia do CCR tem sido melhor compreendida devido ao desenvolvimento da genética e biologia celular. Esta etiologia envolve uma complexa interação entre fatores genéticos individuais e fatores de ordem ambiental, principalmente a dieta. O denominado grupo de risco para o desenvolvimento de CCR inclui: indivíduos com idade superior a 40 anos com histórico pessoal ou familiar de adenoma ou adenocarcinoma colorretal;

antecedentes de câncer no trato gastrointestinal, ginecológico ou na mama; portadores de doenças inflamatórias intestinais ou doenças genéticas ou lesões actínicas colorretais (CAMPOS et al., 2006).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014) os fatores protetores mais importantes no desenvolvimento do CCR são a atividade física e o consumo de alimentos que contêm fibra dietética, ou seja, aqueles de origem vegetal, tais como: frutas, hortaliças (legumes e verduras) e cereais integrais. No entanto, são fatores de risco para esse tipo de câncer: carne vermelha, carnes processadas (como mortadelas, presuntos, salsichas, linguiças), bebidas alcoólicas, tabagismo, gordura corporal e abdominal. Por outro lado, estudos já mostraram que os alimentos contendo probióticos podem modular benéficamente a microbiota intestinal do hospedeiro, contribuindo para a inibição da carcinogênese (BEDANI; ROSSI, 2009).

A microbiota intestinal auxilia a produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC). Reconhece-se que os AGCC exercem papel fundamental na fisiologia normal do colón, no qual constituem a principal fonte de energia para os enterocitos e colonocitos, estimulam a multiplicação celular do epitélio, o fluxo sanguíneo visceral e intensificam a absorção de sódio e água, auxiliando na redução da carga osmótica de carboidrato acumulado. O ácido butírico é o alimento preferido dos colonocitos e é produzido pela ação da fermentação das bactérias intestinais sobre a fibra dietética, particularmente os prebióticos (ALMEIDA et al., 2009).

Conforme Coppini et al. (2000), a carência de fibras aumenta o tempo de trânsito intestinal, elevando a concentração do conteúdo luminal e permitindo maior contato de agentes nocivos e carcinógenos eventualmente presentes na luz com a mucosa colônica. Dentre estes agentes, os metabólicos dos ácidos graxos (sais biliares) gerados pelo metabolismo de gorduras e proteínas animais seriam os elementos determinantes de alterações epiteliais, podendo culminar com o desenvolvimento de células neoplásicas no colón.

Diante de sua gravidade, salienta-se a importância de se reconhecer medidas dietéticas que possam ter influência na diminuição do risco de desenvolvimento do CCR, assim como interferências terapêuticas em seu

tratamento. Dentre estas medidas dietéticas, destacam-se a utilização de alimentos prebióticos e probióticos (INCA, 2003).

### **1.1.6 Probióticos x Câncer Colorretal**

Urbanska et al. (2009) estudaram as propriedades de células bacterianas probióticas microencapsuladas em uma formulação de iogurte em ratos portadores de linhagem germinativa com mutação no gene APC, ou seja com pré disposição para CCR. A administração oral diária do iogurte contendo *L. acidophilus* microencapsulado resultou em significativa supressão da incidência de tumor de colón, multiplicidade e tamanho do tumor. Além disso, os animais tratados exibiram menos neoplasia intra-epitelial com um menor grau de displasia em tumores.

Um estudo de corte realizado na Holanda demonstrou que a ingestão de produtos lácteos fermentados não foi associado de forma significativa ao risco de desenvolvimento do CCR em uma população de idosos com uma variação relativamente ampla no consumo de produtos lácteos. Após 1 semana de administração, nenhuma associação inversa com câncer foi encontrada. Aparentemente, os estudos de caso controle indicam efeitos protetores contrários aos demonstrados pelos estudos prospectivos (RAFTER, 2003).

Os mecanismos precisos pelos quais os probióticos inibem o câncer de colón podem envolver múltiplas vias, incluindo o ciclo celular, espécies reativas de oxigênio, apoptose, produção de enzimas bacterianas específicas e efeitos sobre o metabolismo do indivíduo (ZHU et al., 2011).

Dentre as influências dos probióticos relacionadas ao ciclo celular, destaca-se a sua relação com a biossíntese das poliaminas, cátions orgânicos com múltiplas funções relacionadas com a multiplicação e diferenciação celular. As poliaminas desempenham importante papel em praticamente todas as etapas da tumorigenese colorretal. Portanto, para que a funcionalidade da célula esteja preservada, torna-se necessário que a quantidade de poliamina intracelular seja estritamente controlada. A administração de probióticos revela-se como importante meio de controle da síntese de poliaminas (ZHU et al., 2011).

Orlando et al. (2009) revelaram que a administração de *L. rhamnosus* GG induziu uma diminuição significativa na biossíntese de poliamina em células carcinogênicas. O efeito antiproliferativo dos microrganismos probióticos foi observado 24 horas após o início do tratamento. A capacidade antiproliferativa dos probióticos também foi relacionada a sua habilidade de aderir a células.

Outras referências estão relacionadas à habilidade que os lactobacilos e as bifidobactérias teriam em diminuir as enzimas  $\beta$ -glicuronidase e nitroreductase, produzidas por bactérias patogênicas. Estudos em animais revelaram que o consumo de iogurtes reduziu a atividade dessas enzimas, indicando possível mecanismo pelo qual os probióticos podem prevenir o CCR (DE MORENO DE LEBLANC; PERDIGON, 2005). Em concordância, estudos em humanos mostraram que o consumo de *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus* também reduziu significativamente a atividade dessas enzimas (SPANHAAK; HAVENAAR; SCHAAFSMA, 1998). Resultados similares foram obtidos por Lidbeck et al. (1992), que suplementaram a dieta de 14 pacientes com câncer de cólon com *L. acidophilus*, aproximadamente  $3 \times 10^{11}$  lactobacilos por dia, por período de 6 semanas e obtiveram redução de 14 % na atividade da enzima  $\beta$ -glicuronidase.

Outros estudos demonstraram claramente a capacidade de probióticos em modificar as atividades enzimáticas bacterianas associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de CCR (OUHNIK et al., 1996), indicando que a administração de probióticos é eficaz para a saúde intestinal, preservando e estimulando bactérias benéficas, permitindo que o intestino permaneça saudável e diminuindo o risco de desenvolvimento de CCR.

### **1.1.7 Modelo Animal e Agente Carcinogênico**

O desenvolvimento da carcinogênese do cólon é caracterizada pelo desenvolvimento inicial de focos de criptas aberrantes (FCA) (BIRD, 1987), que são lesões com alterações morfológicas e moleculares características na mucosa colônica, que apresentam displasia e proliferação anormal e podem ser consideradas lesões pré neoplásicas (BIRD; GOOD, 2000). Uma cripta aberrante é, pelo menos duas vezes, maior que as criptas vizinhas normais (CHENG; LAI, 2003) e seu número e tamanho se correlacionam diretamente

com o risco de desenvolver câncer de cólon (WARGOVICH et al., 2000), sendo considerado, um marcador para compostos indutores e inibidores da carcinogênese colorretal (DEMARZO; GARCIA, 2004; NEWELL; HEDDLE, 2004).

Estudos experimentais empregando modelos animais têm demonstrado valor inestimável para testar e aprimorar hipóteses relacionando a dieta com o câncer colorretal. A prevenção está relacionada à regressão, inibição ou eliminação de lesões pré-neoplásicas, com consequente redução da incidência de câncer (BIRD; GOOD, 2000).

Os roedores, como modelo experimental, são mais comumente utilizados para o estudo do câncer colorretal esporádico induzido pelo uso de substâncias carcinogênicas do cólon, como a 1,2 dimetil-hidrazina (DMH) e azoximetano (AOM) (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

O estudo da patogênese do câncer do cólon induzido por substância carcinogênica em modelos de roedores apresenta vantagens, uma vez que os modelos são altamente reprodutíveis, e podem ser facilmente testados em animais de diferentes origens genéticas, além da patogênese permitir reproduzir o CCR humano, pelo menos nas fases iniciais. A elevada frequência de tumores gerados dentro do cólon distal dos roedores, bem como, a histogênese de múltiplos adenomas com subsequente desenvolvimento de adenocarcinomas, reforça a importância desta espécie para o estudo do câncer de cólon (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

A indução do câncer de cólon, por meio do uso da droga DMH, constitui uma boa ferramenta para explorar a relação entre focos de criptas aberrantes (FCA) e câncer de cólon. A DMH induz a multiplicação de tumores no cólon, especialmente no sigmóide e reto, podendo também ocorrer ao redor da junção duodeno-jejuno. O mecanismo de ação dessa droga provavelmente interfere no processo de metilação do DNA, via citocromo P450. A DMH é um dos agentes mais empregados em modelos experimentais de carcinogênese de cólon em roedores (LARANGEIRA et al., 1998).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de refrigerantes e de bebidas não Alcoólicas. BNA Brasil Relatório 2011. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/76685634/Relatorio-ABIR-2011>>. Acesso em: 18 de março, de 2013.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIBET, V. B. P. Disbiose Intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 24, n. 1, p. 58 - 65, 2009.

ANDRADE, P. F. S. Análise da Conjuntura Agropecuária - Fruticultura - safra 2011/12. Estado do Paraná. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. 2012. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura\\_2011\\_12](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2011_12)>. Acesso em : 05 de abril de 2013.

ANTUNES, A. E. C.; LISERRE, A. M.; COELHO, A. L. A.; MENEZES, C. R.; MORENO. I.; OTSUYANAGI, K.; AZAMBUJA, N. C. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 125 – 131, 2013.

ARAUJO, L. M. **Produção de alimentos funcionais formulados com xilitol a partir de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

BARNES, S.; PRASAIN, J.; D’ALESSANDRO, T.; WANG, C. C.; ZHANG, H. G.; KIM, H. Chapter 32 - Soy Isoflavones. **Nutritional Oncology**, p. 559 – 571, 2006.

BASTOS, M. S. R.; GURGEL, T. E. P.; SOUSA, M. S. M. F.; LIMA, I. F. B.; SOUZA, A. C. R.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 240 - 242, 2002.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota Intestinal e Probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 15: p.19 - 28, 2009.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, v. 37, p. 147 - 151, 1987.

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, n. 112 - 113, p. 395-402, 2000.

BIRD. R. P. Role of aberrante crypt foci in understanding the pathogenesis of colon câncer. **Cancer Latters**, v. 51, p. 55 - 71, 1995.

BODGER, K. Colorectal cancer. **Journal of the Royal College of Physicians**, London, v. 34, p. 197-201, 2000.

BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; ANDRIEUX, C.; BISETTI, N.; BRIET, F.; RAMBAUD, J. C. Effects of *Bifidobacterium* sp. fermented milk ingested with or without inulin on colonic Bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, p. 269–273, 1996.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Resolução nº 18 de 03 de dezembro de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em. <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>.

CAMPOS, F. G. et al. Influencia da dieta na gênese do câncer colorretal. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, Nutrição e Câncer**, São Paulo: Atheneu, 2006.

CAPRILES, V. D.; SILVA, K. E. A.; FISBERG, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos: nova tendência no mercado de alimentos funcionais. **Nutrição Brasil**, v. 4, n. 6, p. 327 - 335, 2005.

CARVALHO, A. V.; PEZOA GARCÍA, N. H.; FARFÁN, J. A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 986 - 993, 2008.

CHAMPAGNE, C. P., RAYMOND, Y., GAGNON, R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. **Food Microbiology and Safety**, v. 73, p. 221 - 226, 2008.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, p. 539 - 543, 2008.

CHENG, L.; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n.12, p. 2642 - 9. 2003.

CHOU, C.; HOU, J. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 113 - 121, 2000.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do líquido de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182 - 190, 2005.

COPPINI, L. Z. et al. Fibras alimentares e ácidos graxos de cadeia curta. In: WAITZBERG, D. L. ed. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**, 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

COSTA, M. C. Conservação de polpa de cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum] por métodos combinados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 213 - 215, 2003.

DAVIDSON, P.; CARVALHO, G. Ecologia e disbiose intestinal. In: PASCHOAL V.; NAVES, A.; FONSECA, A. B. B. L. **Nutrição Clínica Funcional: dos princípios à prática clínica**. São Paulo: Valéria Paschoal, 2007.

DAVIS, C. D.; MILNER, J.A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 743 - 752, 2009.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; PERDIGON G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. **Biocell**, v. 29, p.15 - 24, 2005.

DEMARZO, M. M.; GARCIA, S. B. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with chemical carcinogen. **Cancer Letters**, v. 216, p. 31 - 34, 2004.

DING, W. K., SHAH, N. P., Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v. 15, p. 219 - 232, 2008.

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. **Health and nutritional properties of probiotics in food 24 including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba. 34 p. 2001. Disponível em: [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf). Acessado em: janeiro de 2012.

FERREIRA, C. L. L. F; SILVA, A. C. Probióticos e prebióticos na saúde da Criança. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (Eds.). **Alimentos Funcionais – Componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010, Cap. 6, p. 97 - 110.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotic and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 53-61, 1999.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile compositions of some brazilian fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciria dúbia*), Araça-boi (*Eugenia stipitsts*), and Cupuaçu (*Theobroma gradiflorum*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263 – 1265, 2000.

FREIRE, M. T. A.; PETRUS, R. R.; FREIRE, C. M. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; FELIPE, A. M. P. F.; GATTI, J. B. Caracterizacao físico-química, microbiológica e sensorial de polpa de cupuacu congelada (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, n. 1, p. 9 - 16, 2009.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 7, n. 12, p. 9, 2011.

FRITZEN-FREIRE MULLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDENCIO, E.S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 621 - 627, 2010.

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

GRANATO, D.; RIBEIRO, J. C. B.; CASTRO, I. A.; MASSON, M. L. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 121, p. 899 – 906, 2010.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50-55, 2008.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Agrícola. Março de 2012. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201203.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf)>. Acesso em: 20 de março de 2013.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. **Estimativas do Cancer 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. **Falando sobre o Câncer de intestino**. Rio de Janeiro: INCA, 2003.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT Food Science and Technology**, v. 39, p.1221 - 1227, 2006.

KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, p.1317 - 1322, 2008.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR. G. C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock production Science**, v. 97, p. 1 - 12, 2005.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; FERME, A.; LEMOS, R.; PLAPLER, H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-Dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, 1998.

LIDBECK, A.; OVERVIK, E.; RAFTER, J.; NORD, C. E.; GUSTAFSSON, J.A. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces

and urine in humans. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 5, p. 59 - 67. 1992.

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

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, J. M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, p. 764–770, 2013.

MELO, E. A. Efeitos benéficos dos alimentos probióticos e prebióticos. **Revista de Nutrição Brasileira**, p. 174-179, 2004.

Ministério da Educação, Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica. (2007). Cupuaçu. Thematic Pamphlets, Brasília, 28p. <[http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf3/publica\\_setec\\_cupuacu.pdf](http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf3/publica_setec_cupuacu.pdf)> Acesso em 20.10.13.

NEWELL, L. E.; HEDDLE, J. A. The potent colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mutation Research**, v. 14, n. 564, p. 1 - 7, 2004.

NICOLESCO, C. L.; BURULEANU, L. C. Correlation of some substrate parameters in growing *Lactobacillus acidophilus* on vegetable and fruit cocktail juices. **Bulletin UASVM Agriculture**, v. 67, p. 352 - 359, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; MOURA, M.; GODOY, R.; NELE, M.; DELIZIA, R.; VENDRAMINI, A. L. Development of an acai–soymilk beverage: Characterization and consumer acceptance. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, p. 306 - 312, 2010.

ORLANDO, A.; MESSA, C.; LINSALATA, M.; CAVALLINI, A.; RUSSO, F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric and DLD-1 colonic cancer cell lines. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 31, n. 1, p. 108-16.

PEIXOTO, L. L.; SILVA, R. P. P. **Os efeitos dos probióticos e prebióticos na promoção de um organismo saudável**. Monografia (Bacharel em Nutrição) – Universidade Presidente Antonio Carlos, Teófilo Otoni, 2008.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, p. 111 - 123, 2008.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Science Technology**, Amsterdam, v.13, p.3 - 11, 2002.

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1123 - 1126, 2007.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 17. n. 5, 2003.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research Technology**, v. 218, n. 4, p. 380 - 384, 2004.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 183 - 196, 2009.

ROSSI, E. A.; ROSIER, I.; DAMASSO, A. R.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; ABDALA, D. S. P.; TALARICO, V. H.; MINTO, D. F. Determinação de Isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “logurte” de Soja. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 93 - 99, 2004.

SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.

SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; ALAKOMI, H.L.; MATTILA, P.S.; MATTO, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1477 - 1482, 2006a.

SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; NOHYNEK, L.; VAARI, A.; MATTO, J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 171 - 178, 2006b.

SANCHEZ, B.; REYES-GAVILAN, C.D.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 472 - 483, 2009.

SAW, L. K.; CHEN, S.; WONG, S. H.; TAN, S. A.; GOH, K. K. T. Fermentation of tropicalfruit juices by lactic acid bacteria. **12 th ASEAN Food Conference**, 16–18 June, Kangkok, Thailand (p. 80 – 87), 2011.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 894 - 907, 2000.

SHEEHAN, V. M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 279 - 284, 2007.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAFSSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal

microflora and immune parameters in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 899 - 907, 1998.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. NEPA-UNICAMP. 4. ed. Revisada e ampliada. 161 p. Campinas, 2011.

ULIANA, M. R.; VENTURINI FILHO, W. G.; ULIANA, L. R. Nota Científica: Teste de aceitação de bebida mista de soja e amora. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 174 – 181, 2012.

URBANSKA, A. M.; BHATHENA, J.; MARTONI, C.; PRAKASH, S. I. Estimation of the potential antitumor activity of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in Apc (Min/+) mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, p. 264 - 273, 2009.

WARGOVICH, M. J.; JIMENEZ, A.; MCKEE, K.; STEELE, V. E.; VELASCO, M.; WOODS, J.; PRICE, R.; GRAY, K.; KELLOFF, G. J. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1149 - 55, 2000.

WISEMAN, M. Nutrição e câncer. In: MANN, J.; TRUSWELL, A. S. **Nutrição Humana**. v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

WOO, Y. P.; FUNG, W. Y.; EASA, A. M.; LIONG, M. T. Probiotic-fermented soy foods: benefits and enhanced bioactivities. **Acta Alimentaria**, v. 38, n. 3, p. 381-391, 2009.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1501 - 1504, 2003.

ZHU, Y.; MICHELLE LUO, T.; JOBIN, C.; YOUNG, H.A. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 309, n. 2, p. 19 - 127, 2011.

**2. CAPÍTULO 1- DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE NÉCTAR A BASE DE CUPUAÇU E PROTEÍNA DE SOJA UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

## RESUMO

A tendência mundial de consumo de alimentos saudáveis favorecem o crescimento do mercado de sucos e néctares de frutas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um néctar a base de polpa de cupuaçu (18,5 %, 20 %, 30 %, 40 % e 41,5 %) e proteína de soja (0,7 g, 1 g, 1,75 g, 2,5 g e 2,8 g) utilizando Metodologia de Superfície de Respostas (MSR) como a técnica para otimização da formulação. Foram medidos o pH, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e teor de ácido ascórbico (AA) na polpa e nos néctares elaborados. Realizou-se análises microbiológicas de coliformes a 35 °C, a 45 °C e salmonela, afim de assegurar a qualidade das bebidas antes da avaliação sensorial, que foi realizada para determinar aceitação dos néctares em relação ao sabor, impressão global e intenção de compra. Os resultados mostraram na caracterização da polpa, que a mesma encontrava-se dentro dos padrões exigidos pela legislação. Os néctares elaborados também apresentaram-se dentro dos padrões microbiológicos preconizados pela legislação vigente. Em relação as características físico-químicas observou-se que o aumento da concentração de polpa de cupuaçu provocou um incremento linear na ATT e no teor de AA com consequentemente redução do valor de pH. Os néctares tiveram boa aceitabilidade sensorial, com escores médios acima de 5,0 para os atributos sabor e impressão global e acima de 2,0 para a intenção de compra, com exceção do ensaio 4. A partir das superfícies obtidas sugeriu-se que o néctar contenha 20 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja, como a melhor proporção destes componentes, pois este ensaio apresentou características físico-químicas aceitáveis para um néctar, além de situar-se entre os termo hedônicos “gostei ligeiramente e “gostei moderadamente” para os atributos sensoriais.

**Palavras chaves:** cupuaçu, soja, metodologia de superfície de resposta.

## 2.1. INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas não alcoólicas aumentou em todo o Brasil de acordo com estudo realizado pela consultoria Canadean para a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e bebidas não alcoólicas (ABIR). As bebidas prontas pra consumo como refrescos, néctares, bebidas a base de soja, isotônicos e energéticos, foram as principais responsáveis pelo aumento observado (ABIR, 2011).

Além disso, o crescente consumo de alimentos saudáveis que oferecem saúde, conveniência, inovação e sabor favorecem o crescimento do mercado de sucos e néctares de frutas, atraindo a atenção de agricultores, distribuidores e indústria, que buscam atender a demanda (RENUKA et al., 2009).

Na Região Amazônica existem espécies de fruteiras domesticadas ou cultivadas com grande potencial agroindustrial e ainda pouco exploradas. Dentre essas espécies destaca-se o cupuaçueiro (*Theobroma grandiflorum Schum*) e seu fruto apresenta características ideais para o aproveitamento industrial (COSTA et al., 2003), sendo utilizada no preparo sorvetes, sucos, geléias e diversas sobremesas, processados de forma artesanal, ou seja, em pequena escala de produção (COHEN; JACKIX, 2005). Portanto, é fundamental a busca de novos produtos que possam agregar valor a polpa do fruto, como a produção de néctar.

Apesar da variedade de frutas tropicais com sabores exóticos bastante agradáveis, as bebidas contendo extrato de soja também tornaram-se bastante populares. O extrato aquoso de soja, é adequado para a elaboração de bebidas mistas, devido ao seu perfil nutricional com proteínas de boa qualidade, ácidos graxos poliinsaturados, fibras dietéticas, além de seu papel importante na redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, câncer e osteoporose (SILVÁN; BENAVENT; CASTILLO, 2014; RINALDONI; CAMPDERRÓS; PADILLA, 2012; CHEN et al., 2010; XIAO, 2008).

O extrato de soja também é uma boa alternativa para pessoas que não podem consumir produtos lácteos devido a intolerância à lactose ou alergia à proteína do leite (XU; CHANG, 2009). A baixa aceitabilidade de produtos derivados da soja se deve ao sabor de feijão cru, que não é aceita por grande parte da população ocidental (OLIVEIRA et al., 2010). Como alternativa,

bebidas mistas contendo sucos de frutas e extrato de soja, não só mascaram o sabor de feijão cru, mas também combinam as propriedades sensoriais e nutricionais de ambos os produtos.

Para minimizar a rejeição dos consumidores e encontrar a combinação ótima entre as quantidades de fruta e extrato de soja na elaboração de uma bebida com características sensoriais adequadas, pode-se utilizar a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), que baseia-se na variação simultânea de vários fatores (variáveis independentes), previamente selecionados por sua influência nas propriedades do processo (variáveis dependentes ou respostas). Utilizando técnicas matemáticas e estatísticas, os resultados experimentais indicam uma combinação de níveis dos fatores dentro de uma região ótima (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). A MSR tem sido empregada com sucesso para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios e processos na indústria de alimentos (LUO; WANG; SHAHBAZI, 2014; GRANATO et al., 2010; FARRIS; PIERGIOVANNI, 2009).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um néctar de cupuaçu a adicionado de proteína hidrossolúvel de soja, e avaliar a qualidade físico-química e sensorial da bebida utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

Para a elaboração dos néctares, foram utilizados o extrato hidrossolúvel de soja desengordurado (Provesol IF) e a polpa de cupuaçu, cedidos pelas empresas Olvebra<sup>®</sup> Industrial S/A (Brasil) e Bela Ishia<sup>®</sup> Ind. e Com. de polpa de frutas congelada, respectivamente, e sacarose comercial (açúcar cristal) para a correção dos sólidos solúveis totais em 14,5 °Brix no néctar.

### **2.2.1 Caracterização da Polpa de Cupuaçu**

Inicialmente, foi realizada a caracterização físico-química da polpa de cupuaçu, sendo realizadas as análises de: pH, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e teor de ácido ascórbico (AA), para verificar a conformidade com a instrução normativa nº 01, de 7 janeiro de 2000 (BRASIL, 2000). As determinações de pH, SST e ATT foram realizadas segundo metodologias descritas na AOAC (1997). O AA foi determinado por titulometria, baseado na redução do indicador 2,6-diclorofenolindofenol pelo ácido ascórbico, com o resultado expresso em mg de ácido ascórbico por 100 g de polpa (ZENEBON;PASCUET; TIGLEA, 2008).

### **2.2.2 Delineamento Experimental e Elaboração do Néctar**

Para a elaboração dos néctares, as proporções de polpa de cupuaçu e proteína de soja foram definidas segundo um planejamento experimental de Delineamento Composto Central (MONTGOMERY; RUGER, 2009), composto de 4 pontos fatoriais (níveis  $\pm 1$ ), 3 pontos centrais (nível 0), e 4 pontos axiais (níveis  $\pm \alpha$ ) totalizando 11 ensaios, os quais foram realizados em triplicata, com exceção do ponto central. As variáveis independentes utilizadas foram: a concentração de polpa de cupuaçu ( $X_1$ ) e o teor de proteína do extrato hidrossolúvel de soja ( $X_2$ ). Os níveis codificados das variáveis e seus valores reais estão demonstrados na Tabela 1. E como variável dependente (resposta) foi avaliado: pH, ATT, AA, além da aceitação sensorial (sabor e impressão global) e a intenção de compra do néctar.

**TABELA 1:** Matriz do planejamento experimental usando Compósito Central sobre as variáveis independentes polpa de cupuaçu (%) e teor de proteínas para a otimização da formulação do néctar tendo como resposta a aceitação sensorial e a intenção de compra.

Variáveis	Níveis				
	- $\alpha$	(-1)	0	(+1)	+ $\alpha$
Polpa de cupuaçu (%) ( $X_1$ )	18,5	20	30	40	41,5
Teor de proteínas (g) ( $X_2$ )	0,7	1,0	1,75	2,5	2,8
Ensaio	Variáveis originais		Variáveis	codificadas	Respostas
	Polpa de cupuaçu (%)	Teor de proteínas (g)	( $X_1$ )	( $X_2$ )	Y
1	20	1,0	-1	-1	Y <sub>1</sub>
2	20	2,5	-1	+1	Y <sub>2</sub>
3	40	1,0	+1	-1	Y <sub>3</sub>
4	40	2,5	+1	+1	Y <sub>4</sub>
5 (C)	30	1,75	0	0	Y <sub>5</sub>
6 (C)	30	1,75	0	0	Y <sub>6</sub>
7 (C)	30	1,75	0	0	Y <sub>7</sub>
8	41,5	1,75	+ $\alpha$	0	Y <sub>8</sub>
9	18,5	1,75	- $\alpha$	0	Y <sub>9</sub>
10	30	2,8	0	+ $\alpha$	Y <sub>10</sub>
11	30	0,7	0	- $\alpha$	Y <sub>11</sub>

Para a elaboração do néctar, a polpa de cupuaçu, o extrato hidrossolúvel de soja e a sacarose comercial foram pesados e homogeneizados juntamente com água potável. O néctar resultante de cada ensaio foi submetido à pasteurização empregando o binômio temperatura/tempo de 90 °C/ 60 segundos em tacho aberto de aço inoxidável revestido com camisa de vapor. O envase foi realizado a quente (*hot fill*) em garrafas de vidro de 300 mL com tampas plásticas rosqueáveis, sendo posteriormente resfriadas por aspersão de água clorada a 5 ppm e, em seguida, armazenadas em câmara de resfriamento à 4 ± 1 °C até a realização da avaliação microbiológica, físico-química e sensorial.

### **2.2.3 Avaliação Microbiológica**

A qualidade microbiológica dos néctares para coliformes a 35 °C e a 45 °C e ausência ou presença de salmonella sp. de acordo com a metodologia de Silva et al. (2010), foi avaliada imediatamente após o processamento da bebida.

### **2.2.4 Avaliação Físico-química dos Néctares**

As 11 formulações obtidas foram submetidas as análises físico-químicas de pH, SST, ATT e AA como descrito no item 2.1. As análises foram realizadas em triplicata para cada repetição dos 11 ensaios, com exceção do ponto central.

### **2.2.5 Avaliação Sensorial**

A avaliação sensorial dos 11 néctares obtidos foi realizada de acordo com Minim (2013). O teste de aceitação foi realizado por 50 julgadores não treinados, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos com termos variando do “desgostei extremamente” (escore 1) a “gostei extremamente” (escore 9) para os atributos sensoriais sabor e impressão global. Na mesma seção, os julgadores avaliaram a intenção de compra do néctar utilizando uma escala estruturada de cinco pontos com termos variando do “certamente compraria” (escore 5) a “certamente não compraria” (escore 1).

As amostras foram codificadas com números aleatórios de três dígitos e apresentadas aos julgadores, de forma sequencial em copos plásticos de 50 mL a 8 °C. Para a lavagem das papilas gustativas entre a prova das amostras, foram utilizados água mineral à temperatura ambiente e biscoito sem sal.

### **2.2.6 Análise Estatística**

Os resultados obtidos a partir do planejamento composto central foram analisados no software STATISTICA for Windows (versão 7.0; USA), através de análise de variância e superfície de resposta, considerando como variáveis independentes a polpa de cupuaçu (%) e a proteína de soja (g) e como variáveis de resposta, o pH, acidez total titulável, teor de ácido ascórbico,

sabor, impressão global e intenção de compra, que foram descritas pelo modelo de segunda ordem na equação 1:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad \text{equação 1}$$

Onde:  $\hat{y}$  é a resposta prevista,  $\beta_0$  é uma constante,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{12}$  são os coeficientes de regressão, e  $x_1$ ,  $x_2$  são os níveis das variáveis independentes (MONTGOMERY; RUGER, 2009).

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Caracterização da Polpa de Cupuaçu

A polpa de cupuaçu utilizada neste trabalho foi inicialmente caracterizada quanto ao de pH, acidez total titulável (ATT), teor de sólidos solúveis totais (SST) e teor de ácido ascórbico (AA).

O valor médio encontrado para pH foi 3,09, enquanto Costa (2003) e Santos et al. (2010) encontraram valores próximos de 3,34 e 3,42 respectivamente. Já a ATT em ácido cítrico foi de 1,52 %, próximo aos valores encontrados por Freire et al. (2009) (1,61 %), ambas, inferiores a 2,60 % encontrado por Carvalho (2012). Essa diferença na ATT, pode estar relacionada ao tratamento aplicado a polpa, uma vez que Carvalho (2012) utilizou polpa *in natura* e neste trabalho utilizou-se polpa pasteurizada congelada, o que pode ter contribuído para a degradação dos ácidos presentes, logo redução da ATT.

O teor de sólidos solúveis totais da polpa de 9,17 °Brix foi semelhante as médias de 9,24° e 9,82 °Brix encontradas por Freire et al. (2009) e Santos et al. (2010). O teor de sólidos solúveis totais tende a aumentar com o grau de maturação do fruto, pois, com o amadurecimento o amido é hidrolisado e os açúcares complexos vão se transformando em açúcares simples, com consequente redução da acidez.

O teor de ácido ascórbico encontrado para a polpa de cupuaçu foi de 26,37 mg/100 g. De acordo com esse valor, 100 g de polpa supre mais de 50 % da Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos que é de 45 mg (BRASIL, 2005), o que torna a polpa de cupuaçu fonte dessa vitamina. Valores próximos foram encontrados por Vieira; Teixeira; Silva (2000) (33,00 mg/100 g) e pela TACO (2011) (24,5 mg/100 g). É importante destacar que o teor de AA é influenciado por vários fatores, dentre eles local de plantio, clima, modo de cultivo, colheita, armazenamento e variações genéticas de cada fruto (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Brasil (2000) estabelece os seguintes valores mínimos para o padrão de identidade e qualidade de polpa de cupuaçu: sólidos solúveis de 9,00 °Brix, pH de 2,60, acidez total expressa em ácido cítrico de 1,50 g/100 g e ácido ascórbico de 18,00 mg/100 g. Portanto, a polpa utilizada neste trabalho

encontra-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, pois os valores encontrados para estas características estão acima dos valores mínimos preconizados.

### 2.3.2 Estabilidade Microbiológica dos Néctares de Cupuaçu

O tratamento térmico aplicado aos néctares mostrou-se eficiente no controle microbiológico (Tabela 2). A ausência de bactérias do grupo coliforme a 35 °C e a 45 °C e salmonella sp. em todos os ensaios indica que as bebidas foram processadas em condições higiênico-sanitárias adequadas.

**TABELA 2:** Médias da contagem do número mais provável de coliformes a 35 °C e a 45 °C (NMP/50 mL) e de Salmonella (presença/ausência em 25 mL) nos néctares de cupuaçu.

Ensaio	Análises		
	Coliforme a 35 °C	Coliforme a 45 °C	<i>Salmonella</i>
1	< 3,0	< 3,0	ausente
2	< 3,0	< 3,0	ausente
3	< 3,0	< 3,0	ausente
4	< 3,0	< 3,0	ausente
5 (C)	< 3,0	< 3,0	ausente
6 (C)	< 3,0	< 3,0	ausente
7 (C)	< 3,0	< 3,0	ausente
8	< 3,0	< 3,0	ausente
9	< 3,0	< 3,0	ausente
10	< 3,0	< 3,0	ausente
11	< 3,0	< 3,0	ausente

Médias das análises em três garrafas escolhidas aleatoriamente no lote.

Os néctares de cupuaçu elaborados no presente trabalho atenderam aos padrões microbiológicos preconizados pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), para refrescos, sucos e néctares adicionados ou não de conservadores e prontos para consumo, que estabelece ausência de coliformes a 35 °C/50 mL. Os coliformes a 45 °C e salmonella avaliados neste trabalho não apresentam limites específicos na referida legislação, porém foram determinados por serem indicadores de condições higiênicas durante o processamento do produto. Desta forma, pode-se evidenciar que as boas

práticas de fabricação foram cumpridas durante a elaboração e processamento dos néctares, uma vez que, todos os ensaios apresentaram excelente qualidade microbiológica.

Outros autores também relataram a qualidade microbiológica em diferentes néctares ou sucos de frutas com ou sem proteína de soja, após o tratamento térmico (MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2007; DAMIANI et al., 2011; HANSEN et al., 2013)

### **2.3.3 Características Físico-químicas dos Néctares**

Os resultados médios das características físico-químicas e sensoriais dos néctares elaborados são mostrados na Tabela 3. Todas as respostas, com exceção dos sólidos solúveis totais (SST), apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os ensaios, requisito básico para aplicação da metodologia de superfície de resposta.

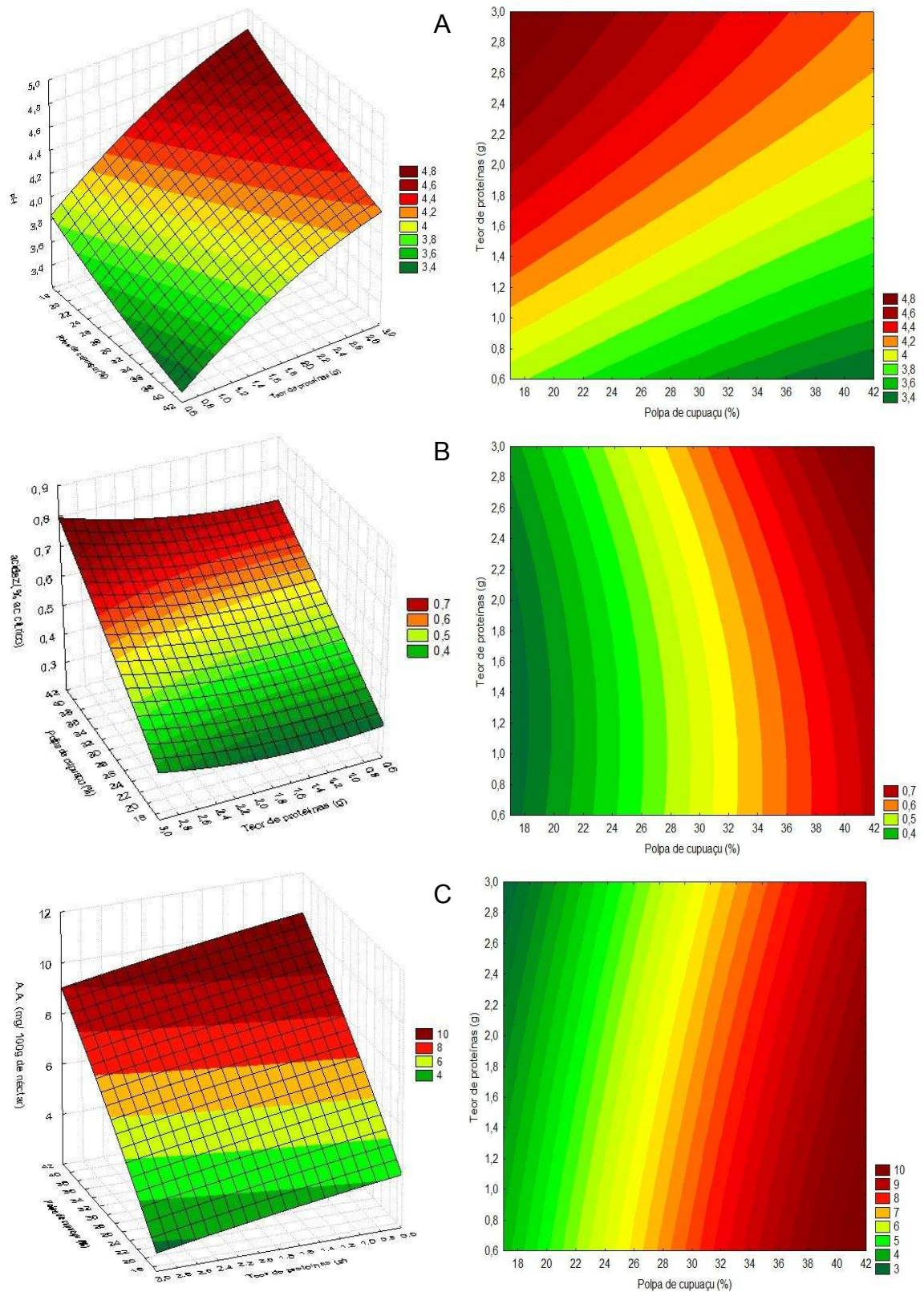
O resultado de SST era esperado, uma vez que, o teor de sólidos solúveis foi ajustado por meio de balanço de massa, para que todos os ensaios tivessem 14,5 °Brix, afim de não influenciar as respostas na avaliação sensorial.

Os valores de pH, acidez total titulável (ATT) e teor de ácido ascórbico (AA) diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre os ensaios. Pode-se observar que os ensaios com maiores quantidades de polpa de cupuaçu apresentaram pH menores e conseqüentemente maiores ATT e teores de AA (Figura 1A, 1B e 1C).

**TABELA 3:** Delineamento experimental usado para a elaboração do néctar e suas características físico-químicas e sensoriais.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes (Respostas)						
	Polpa de cupuaçu (%)	Teor de proteínas (g)	SST	pH	ATT (% ac. cítrico)	A.A. (mg / 100 g de néctar)	Sabor	Impressão global	Intenção de compra
1	20	1,0	14,2 ± 0,36	3,97 ± 0,03	0,354 ± 0,02	4,80 ± 0,11	6,76	6,46	3,20
2	20	2,5	14,4 ± 0,40	4,50 ± 0,02	0,382 ± 0,02	3,97 ± 0,12	6,40	6,28	3,00
3	40	1,0	14,2 ± 0,35	3,55 ± 0,02	0,657 ± 0,04	9,70 ± 2,33	5,98	6,08	2,88
4	40	2,5	14,4 ± 0,25	4,10 ± 0,05	0,714 ± 0,03	8,85 ± 0,19	4,90	5,14	2,18
5 (C)	30	1,75	14,2 ± 0,49	4,06 ± 0,03	0,524 ± 0,01	6,97 ± 0,88	5,86	5,64	2,76
6 (C)	30	1,75	14,3 ± 0,29	4,04 ± 0,03	0,529 ± 0,02	7,12 ± 1,39	5,90	5,88	2,82
7 (C)	30	1,75	14,2 ± 0,29	4,10 ± 0,05	0,510 ± 0,02	6,95 ± 1,84	5,92	5,98	2,92
8	41,5	1,75	14,4 ± 0,37	3,83 ± 0,05	0,713 ± 0,00	9,84 ± 1,11	5,60	5,30	2,36
9	18,5	1,75	14,5 ± 0,06	4,41 ± 0,03	0,335 ± 0,02	3,82 ± 1,07	6,14	6,42	3,08
10	30	2,8	14,5 ± 0,35	4,43 ± 0,05	0,583 ± 0,02	6,36 ± 0,94	6,04	6,04	3,16
11	30	0,7	14,5 ± 0,40	3,55 ± 0,07	0,511 ± 0,01	7,61 ± 1,38	6,54	6,62	3,50

C = ponto central; SST = sólidos solúveis totais; ATT = acidez total titulável; A.A = Ácido Ascórbico.



**FIGURA 1:** Superfície de resposta e contorno do efeito da polpa de cupuaçu (%) e proteína de soja (g) sobre o pH (1A), acidez total titulável (1B) e teor de ácido ascórbico (1C) em néctar a base de cupuaçu e proteína de soja.

A análise de variância confirmou que o modelo quadrático foi significativo para todas as respostas avaliadas, uma vez que, o planejamento composto central é muito utilizado para ajustar superfícies de segunda ordem (MONTGOMERY; RUNGER, 2009). A resposta pH, foi adequadamente descrita pelo modelo ajustado (Tabela 4) e explica 99,52 % de todos os dados de variância. O percentual de polpa de cupuaçu apresentou coeficiente de regressão linear negativo significativo, comprovando seu efeito na redução do pH.

**TABELA 4:** Modelos ajustados para as respostas pH, ATT e AA em função da polpa de cupuaçu (C) e proteína de soja (S) e respectivos coeficientes de determinação.

Respostas	Modelo Ajustado	R <sup>2</sup>
pH	$\hat{y} = 4,0108 - 0,0384xC^* + 0,0003xC^2 + 0,7266xS^*$ $- 0,0787xS^{2*} - 0,0016xCxS$	0,9952
ATT	$\hat{y} = 0,0693 + 0,0160xC^* - 0,00002xC^2 - 0,0647xS^*$ $+ 0,0191xS^{2*} + 0,0009xCxS$	0,9976
AA	$\hat{y} = - 1,0557 + 0,3449xC^* - 0,0015xC^2 - 0,4196xS^*$ $- 0,0393xS^2 - 0,0006xCxS$	0,9984

ATT = acidez total titulável; AA = ácido ascórbico; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

A ATT variou de 0,335 % a 0,714 % de ácido cítrico, sendo que estes valores foram observados no ensaio 9 (18,5 % de cupuaçu e 1,7 g de proteína de soja) e no ensaio 4 (40 % de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja). A Figura 1B mostra a superfície de resposta, onde é possível perceber o efeito linear da polpa de cupuaçu, que apresentou coeficiente de regressão linear significativo positivo (Tabela 4), confirmando o aumento da acidez nos ensaios com maiores quantidade de polpa. O modelo ajustado explica 99,76 % dos dados experimentais da ATT.

O teor de AA variou de 3,82 a 9,84 mg de AA / 100 mL de néctar para os ensaios 9 e 8, ou seja, aqueles com menor e maior percentual de polpa de cupuaçu. Na Figura 1C, é possível verificar o efeito linear dessa variável sobre o AA, ou seja, foi aquela que mais contribuiu para o teor de AA, e que teve o modelo ajustado com 99,84 % dos dados (Tabela 4).

### 2.3.4 Avaliação Sensorial dos Néctares de Cupuaçu

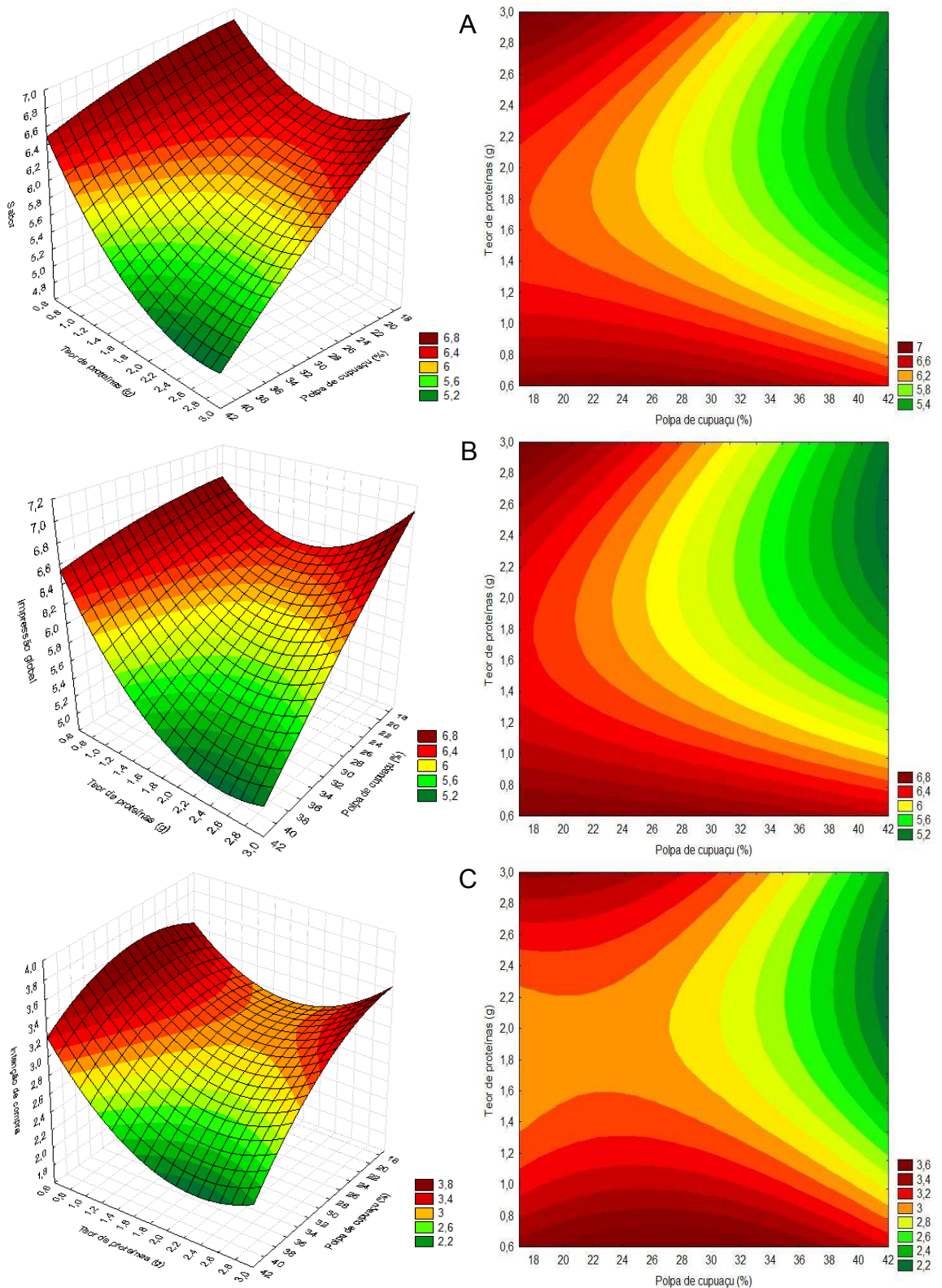
Os escores da aceitação sensorial dos néctares estão mostrados na Tabela 3. Todos os ensaios apresentaram valores médios acima de 5 (Indiferente) para o atributo sabor, com exceção do ensaio 4 (40 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja), que obteve 4,9. Para a impressão global este ensaio recebeu um escore de 5,14, que também corresponde ao mínimo obtido para este atributo.

Sabe-se que os produtos com escores elevados de aceitação têm maior potencial de sucesso no mercado (DUTCOSKY et al., 2006). Granato et al. (2010) ao avaliarem uma sobremesa a base de suco de goiaba (SG) e proteína de soja (PS) observaram que os ensaios 1 (22 % SG e 1 % PS), 2 (22 % SG e 2 % PS), 3 (22 % SG e 3 % PS) e 5 (27 % SG e 2 % PS) não foram considerados sensorialmente aceitáveis, pois obtiveram médias inferiores a 5,0. Os ensaios 4 (27 % SG e 1 % PS), 6 (27 % SG e 3 % PS), 7 (32 % SG e 1 % PS), 8 (32 % SG e 2 % PS), 9 (32 % SG e 3 % PS) e 10 (27 % SG e 2 % PS) obtiveram média hedônica variando de “Indiferente” (5,00) a “gostei ligeiramente” (6,00).

Torrezan et al. (2004) ao avaliarem o perfil sensorial de alimento com soja sabor laranja, observaram que as notas atribuídas às amostras mostraram-se relativamente inferiores em relação ao sabor e impressão global concentrando-se na parte inferior da escala “desgostei ligeiramente” (4,0), principalmente em relação ao sabor.

Por meio dessas informações, pode-se considerar neste trabalho que somente o ensaio 4, não seria considerado como potencial para o mercado consumidor de alimentos a base de soja.

Analisando as superfícies de resposta para os atributos sabor e impressão global, observa-se que ambas apresentam um comportamento semelhante (Figura 2A e 2B). A polpa de cupuaçu apresentou coeficiente de regressão linear positivo significativo para os dois atributos (Tabela 5). Assim, o aumento do percentual de polpa nos néctares provoca menor aceitação pelos julgadores, principalmente nos ensaios, com maiores teores de proteína de soja, daí o seu coeficiente linear negativo.



**FIGURA 2:** Superfície de resposta e contorno do efeito da polpa de cupaçu (%) e proteína de soja (g) sobre o sabor (2A), impressão global (2B) e intenção de compra (2C) em néctar a base de cupaçu e proteína de soja.

Para os ensaios com menores concentrações de polpa, observou-se o efeito quadrático significativo da proteína de soja, com coeficientes positivos,

ou seja, houve um aumento dos escores para os ensaios com menores (0,7 g) e maiores (2,8 g) proporções de proteína de soja. Resultado diferente foi encontrado por Valim et al. (2003) na avaliação sensorial de suco de laranja contendo extrato hidrossolúvel de soja com diferentes concentrações de proteína e ácido cítrico. Os autores verificaram, através da metodologia de superfície de resposta, que a formulação que apresentou maior aceitabilidade com média hedônica de 7,2, foi a preparada com concentrações de 0,71 g/100 mL de ácido cítrico e 1,22 g de proteína /100 mL.

**TABELA 5:** Modelos ajustados para as respostas sabor, impressão global e intenção de compra em função da polpa de cupuaçu (C) e proteína de soja (S) e respectivos coeficientes de determinação.

Respostas	Modelo Ajustado	R <sup>2</sup>
Sabor	$\hat{y} = 7,1174 + 0,0298xC^* - 0,0005xC^2 - 0,7917xS^*$ $+ 0,3290xS^2 - 0,0240xCxS$	0,8971
Impressão Global	$\hat{y} = 7,2159 + 0,0258xC^* - 0,0004xC^2 - 0,9569xS^*$ $+ 0,3976xS^2 - 0,0253xCxS$	0,9508
Intenção de compra	$\hat{y} = 2,7749 + 0,1094xC^* - 0,00186xC^2 - 1,04479xS^*$ $+ 0,3618xS^2 - 0,0153xCxS$	0,9304

Para a intenção de compra o menor escore obtido foi de 2,18 para o ensaio 4 (40 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja), enquanto que, o maior (3,50) foi observado no ensaio 11 (30 % de polpa de cupuaçu e 0,7 g de proteína de soja), situando-se entre os termos “tenho dúvida se compraria” e “provavelmente compraria”.

A superfície de resposta mostra duas regiões onde os escores de intenção de compra foram maiores (Figura 2C). Nos ensaios com menores quantidades de soja, independente da quantidade de polpa de cupuaçu, e nos ensaios com menores quantidade de polpa e maiores quantidades de proteína de soja.

O percentual de polpa de cupuaçu apresentou coeficiente de regressão linear positivo significativo (Tabela 5), ou seja, com o aumento da concentração desta variável, há um decréscimo na intenção de compra dos julgadores, principalmente nos ensaios com maior teor de proteína de soja. A quantidade de soja, por outro lado, mostrou comportamento linear e quadrático, com seus coeficientes de regressão significativos. O coeficiente quadrático positivo aumenta a resposta de intenção de compra nos ensaios com o máximo e

mínimo da quantidade de proteína de soja e menores percentuais de polpa de cupuaçu.

Observando as superfícies de resposta para as características sensoriais de sabor, impressão global e intenção de compra, selecionou-se a formulação correspondente ao ensaio 2 (20 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja), pois verificou-se que a região ótima para todas as respostas esta diretamente relacionada com o percentual de polpa de cupuaçu, ou seja quanto menos polpa, maior a aceitação pelos julgadores e como a quantidade de soja apresentou comportamento quadrático, optou-se pela maior quantidade de proteína de soja, em função dos efeitos benéficos da soja à saúde (CHEN et al., 2010; ZOWAIL et al., 2012; SILVÁN; BENAVENT; CASTILLO, 2014).

## 2.4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na caracterização físico-química da polpa de cupuaçu revelaram que a mesma encontrou-se de acordo com a legislação para os parâmetros: pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável e teor de ácido ascórbico.

Os néctares elaborados a partir da polpa de cupuaçu e adicionado de proteína de soja mantiveram-se dentro dos padrões microbiológicos aceitáveis segundo a legislação vigente após o processamento, indicando condições higiênico-sanitárias de processamento satisfatórias e eficiência do tratamento térmico aplicado.

As características físico-químicas dos néctares elaborados apresentaram diferenças no pH, acidez total titulável e teor de ácido ascórbico, entre os ensaios, principalmente pelo efeito linear significativo causado pela concentração de polpa de cupuaçu.

A avaliação sensorial evidenciou que a concentração de polpa de cupuaçu foi significativa para a aceitação da bebida, fato observado pelos maiores escores nos ensaios que continham menores quantidades dessa variável, adotando-se como formulação otimizada o ensaio 2, contendo 20% de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de refrigerantes e de bebidas não Alcoólicas. BNA Brasil Relatório 2011. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/76685634/Relatorio-ABIR-2011>>. Acesso em: 18 de março, de 2013.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. In Fruits Juices. 16<sup>th</sup> ediion, v. II, Maryland: AOAC International, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP, 2002. 401p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005: Aprova o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Aprova os regulamentos técnicos para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa das seguintes frutas: acerola, cacau, cupuaçu, graviola, açai, maracujá, caju, manga, goiaba, pitanga, uva, mamão, cajá, melão e mangaba. Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000. **Diário Oficial da União** de 10 de janeiro de 2000, seção 1, Pagina 54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA-. Resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 12 de janeiro de 2001.

CARVALHO, C. A. C. Pré-resfriamento e refrigeração de cupuaçu. f. 63. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Acre. Rio Branco, 2012.

CHEN, H.; LI-JUN, L.; JIAN-JUN, Z.; BO, X.; RUI, L. Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. **Food Chemistry**, v.11, p. 1633 - 1636, 2010.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 2005. 535 p.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do líquido de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182 - 190, 2005.

COSTA, M. C. Conservação de polpa de cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum] por métodos combinados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 213 - 215, 2003.

DAMIANI, C.; SILVA, F. A.; AMORIM, C. C. M.; SILVA, S. T. P.; BASTOS, I. M.; ASQUIERI, E. R.; VERA, R. Néctar misto de cajá-manga com hortelã: Caracterização química, Microbiológica e sensorial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 3, p. 301 - 309, 2011.

DUTCOSKY, S. D.; GROSSMANN, M. V. E.; SILVA, R. S. F.; WELSCH, A. K. Combined sensory optimisation of a prebiotic cereal product using multicomponent mixture experiments. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 630 - 638, 2006.

FARRIS, F.;PIERGIOVANNI, L. Optimisation of manufacture of almond paste cookies using response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 32, p. 64 - 87, 2009.

FREIRE, M. T. A.; PETRUS, R. R.; FREIRE, C. M. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; FELIPE, A. M. P. F.; GATTI, J. B. Caracterizacão físico-química, microbiologica e sensorial de polpa de cupuaçu congelada (*Theobroma grandiflorum Schum*). **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, n. 1, p. 9 - 16, 2009.

GRANATO, D.; RIBEIRO, J. C. B.; CASTRO, I. A.; MASSON, M. L. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 121, p. 899 – 906, 2010.

HANSEN. O. A. S.; CARDOSO, R. L.; FONSECA, A.A. O.; VIANA, E. S.; HANSEN, D. S.; BARRETO, N. S. E. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de néctar de mangaba. **Magistra**, v. 25, n. 2, p. 148 - 156, 2013.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TILEA, P. **Métodos Físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. 1ª edição digital- São Paulo:Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LUO, Z.; WANG, L.; SHAHBAZI, A. Optimization of ethanol production from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) juice using response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 53 - 59, 2014.

MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Estabilidade do néctar misto de cajá e umbu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 456 - 463.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudo com Consumidores**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2013.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER,G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. 4 ed. Rio de Janeiro, LTC, 2009.

OLIVEIRA, M. A.; MOURA, M.; GODOY, R.; NELE, M.; DELIZIA, R.; VENDRAMINI, A. L. Development of an acai–soymilk beverage: Characterization and consumer acceptance. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, p. 306 - 312, 2010.

RENUKA, B.; KULKAMI, S. G.; VIJAYANAND, P.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the

quality characteristics. **LWT Food Science and Technology**, v. 42, p. 1031 - 1033, 2009.

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

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; COSTA, J. M. C.; FONSECA, A. V. V. Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1636 - 1642, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Ed. Varela, 2010.

SILVÁN, J. N.; BENAVENT, M. A.; CASTILLO, M. D. **Chapter 23 – Antioxidant properties of soy-based drinks and effects of processing: Processing and impact on antioxidants in beverages**. p. 225 – 232, 2014.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. NEPA-UNICAMP. 4. ed. Revisada e ampliada. 161 p. Campinas, 2011.

TORREZAN, R.; CECCATO, C. M. ; BARRETTO, A. C. S.; SILVA, V. S.; CARATIN, C.; PEREIRA, C. G.; MARTINEZ, J. KUSHIDA, M. M.; NETO, M. P.; IAMANAKA, B.; CARDELLO, H. M. A. B. Avaliação do perfil sensorial de alimento com soja sabor laranja. **Boletim CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 199 - 216, 2004.

VIEIRA, M. C.; TEIXEIRA, A. A.; SILVA, C. L. M. Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) néctar. **Journal of Food Engineering**, v. 43, p.1 - 7, 2000.

XIAO, C.W. Health effects of soy protein and isoflavones in human. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1244S - 1249S, 2010.

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

ZOWAIL, M. E. M.; WAER, H. F. M.; HANAFI, N.; KHATER, E. H. S.;EL-MANCY, H. A. The Evidence For Soybean Products As Cancer Preventive Agents. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 48, p. 394 – 406, 2012.

**3. CAPÍTULO 2 - NÉCTAR DE CUPUAÇU E PROTEÍNA DE SOJA COM  
ADIÇÃO DE PROBIÓTICOS: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,  
VIABILIDADE E RESISTÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL  
SIMULADO**

## RESUMO

A viabilidade de bactérias probióticas veiculadas em matrizes alimentares é de grande preocupação, pois um número significativo de células morre durante o processamento e armazenamento dos produtos alimentares, e durante a passagem através do trato gastrointestinal. Este trabalho objetivou desenvolver um néctar de cupuaçu adicionado de proteína de soja e *L. acidophilus* LA-3 (T<sub>1</sub>), *L. paracasei* BGP1 (T<sub>2</sub>) e a mistura *L. acidophilus* LA-3 / *L. paracasei* BGP1 (T<sub>3</sub>), resultando em três tratamentos, além do controle sem adição de probióticos. O pH, a acidez total titulável, a cor, o teor de ácidos orgânicos, a viabilidade celular e resistência *in vitro* às condições gastrointestinais foram monitorados até o 28º dia de armazenamento a 4 ± 1 °C. A aceitabilidade sensorial foi realizada no último dia de armazenamento. Embora tenha sido observado um aumento da acidez e a diminuição do pH durante as quatro semanas de armazenamento, a viabilidade das culturas utilizadas foi mantida em pelo menos 7,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup> em todos os néctares por todo o período de armazenamento. Não houve diferença significativa (p > 0,05) entre os tratamentos para os parâmetros de cor avaliados. O tratamento T<sub>1</sub> apresentou a menor sobrevivência ao final da simulação gastrointestinal *in vitro* com 3,35 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, foram mais tolerantes ao estresse com contagens de 6,13 e 5,35 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Na avaliação sensorial, os tratamentos controle e T<sub>1</sub> tiveram a melhor aceitação, possivelmente em decorrência da menor acidez apresentada.

**Palavras chave:** néctar de cupuaçu, lactobacilos, resistência gastrointestinal *in vitro*

### 3.1. INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas não alcoólicas aumentou em todo o Brasil de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e bebidas não alcoólicas (ABIR). As bebidas prontas pra consumo como refrescos, néctares, bebidas a base de soja, isotônicos e energéticos, foram as principais responsáveis pelo aumento observado (ABIR, 2011).

Para as bebidas de frutas um dos diferenciais que contribuem para a conquista de novas parcelas do mercado é a utilização de frutas nativas associados principalmente à possibilidade de consumir algo de aparência e sabor diferentes, e que também apresentem uma identidade, como o exemplo o umbu do sertão, o cajá da mata (MOTA et al., 2008) e o buriti do cerrado.

O cupuaçu, fruta tropical típica da floresta amazônica, apresenta características desejáveis para a produção de bebidas saudáveis prontas para consumo. Além disso, possui sabor exótico e agradável, é rico em compostos voláteis e sais minerais além de possuir alto teor de pectina (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009), uma fibra solúvel, que tem demonstrado redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos (PIEIDADE; CANNIATTI-BRAZACA, 2003; FREITAS; JACKIX, 2005; EUFRÁSIO et al., 2009).

Os consumidores estão mais conscientes e preocupados com seu estilo de vida, o que aumentou a demanda de alimentos que promovam a saúde e bem-estar, tais como produtos funcionais contendo microrganismos probióticos (MARTINS et al., 2013).

A maioria dos produtos probióticos disponíveis no mercado é de base láctea como leites fermentados, iogurtes, sorvetes e queijos (KAILASAPATHY, 2006; HOMAYOUNI et al., 2008; SANCHEZ et al., 2009; FRITZEN-FREIRE MULLER; LAURINDO; PRUDENCIO, 2010), havendo, nos últimos anos, um crescente interesse na elaboração de produtos probióticos não lácteos, principalmente devido ao grande número de pessoas intolerantes à lactose ou com dietas restritas em colesterol (MARTINS et al., 2013).

Entre os alimentos não lácteos estudados como veículos de culturas probióticas estão os sucos e néctares de fruta (SHEEHAN; ROOS; FITZGERALD, 2007, CHAMPAGNE; GARDNER, 2008; NICOLESCO; BURULEANU, 2010; SAW et al., 2011; ANTUNES et al., 2013). Estes são

adequados para os consumidores que são intolerantes à lactose (PRADO et al, 2008), além de conterem grandes quantidades de açúcares, fundamentais para a sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento (DING; SHAH, 2008).

Outro substrato bastante utilizado como veículo de probióticos é a soja. Produtos de soja, além de serem uma boa fonte de proteína, fibras, oligossacarídeos, minerais e vitaminas, podem ajudar a reduzir a incidência de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, o risco de carcinogênese, e levar a melhoria da saúde óssea e alívio dos sintomas da menopausa (BEDANI et al, 2006;. XIAO, 2008; BEDANI et al., 2010.; CHEN et al., 2010).

Diante da demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis, capazes de trazer benefícios extras à saúde, e dos potenciais efeitos benéficos da soja e dos probióticos, este trabalho propôs-se a elaborar um néctar de cupuaçu adicionado de proteína de soja e probióticos e avaliar as alterações físico-químicas, cor, viabilidade probiótica e resistência ao estresse gastrointestinal simulado durante o armazenamento refrigerado da bebida.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Delineamento Experimental**

No Capítulo 1 foram realizados o desenvolvimento e a otimização da formulação do néctar de cupuaçu adicionado de proteína hidrossolúvel de soja.

A partir da formulação ótima (20% de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteínas de soja), foram adicionadas culturas liofilizadas prontas para uso direto (DVS – Direct Vat Set) de *L. acidophilus* LA-3 (Sacco® Brasil, Campinas - SP) e *L. paracasei* BGP 1 (Sacco® Brasil, Campinas - SP). Foram elaborados o néctar de cupuaçu adicionado de proteína de soja e *L. acidophilus* LA-3 (T<sub>1</sub>), *L. paracasei* BGP 1 (T<sub>2</sub>) e com a mistura das duas culturas probióticas, na proporção de 1:1 (T<sub>3</sub>), além do tratamento controle sem adição da cultura probiótica. Foram realizadas 3 repetições para todos os tratamentos.

### **3.2.2 Preparo e Inoculação de Culturas Probióticas no Néctar de Cupuaçu e Proteína de Soja**

Para a ativação dos *Lactobacillus*, os envelopes com as culturas probióticas liofilizadas foram abertos em condições assépticas, pesados e transferidos para frascos contendo extrato hidrossolúvel de soja desengordurado 6 % (m/v) estéril (121 °C por 5 minutos em autoclave) e incubados por 24 horas em repouso a 37 °C (MONDRAGÓN BERNAL, 2004). Após o período de incubação, o inóculo contendo 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> foi adicionado ao néctar na proporção de 1:9 (v/v). Todas as etapas de manipulação dos microrganismos, tanto na forma liofilizada para sua ativação, como sua inoculação no néctar, foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

### **3.2.3 Elaboração e Armazenamento do Néctar**

Para o processamento do néctar, a polpa de cupuaçu, a proteína hidrossolúvel de soja e a sacarose comercial foram pesadas e homogeneizadas juntamente com água potável. O néctar resultante foi submetido à pasteurização empregando o binômio temperatura/ tempo de 90 °C/ 60 segundos em tacho aberto de aço inoxidável revestido com camisa de vapor. O envase do néctar foi realizado a quente (*hot fill*) em garrafas de vidro de 300 mL estéreis. Após o fechamento com tampas plásticas

rosqueáveis, as garrafas foram resfriadas por aspersão de água clorada a 5 ppm, e ao atingirem a temperatura de 37 °C, os néctares foram inoculados com as culturas probióticas e em seguida armazenados em câmara de resfriamento à 4 ± 1 °C, até a realização das análises.

### 3.2.4 Avaliação Físico-química e de Cor do Néctar

As amostras dos néctares foram submetidas as análises físico-químicas de pH, acidez total titulável (ATT) e de cor, nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado. As determinações de pH e ATT foram realizadas segundo metodologias descritas pela AOAC (1997).

A coloração do néctar foi determinada por colorimetria, em colorímetro Minolta CR-10 (Minolta Corporation, Osaka, Japan) pela leitura direta de reflectância das coordenadas L\*, a\* e b\*, empregando a escala CIELAB, sendo que L\* mede a luminosidade e varia de 0 (preto) a 100 (branco), a\* indica a posição da cor entre vermelho (+a) e verde (-a) e b\* entre amarelo (+b) e azul (-b). O índice de cor (IC) que mede a cor característica do produto, a intensidade de cor ou Chroma (c\*) e o ângulo hue (h°) foram calculados a partir dos valores de L\*, a\* e b\*, conforme as equações 1, 2 e 3.

$$IC = 1000 \times a^* / L^* \times b^* \quad (1)$$

$$c^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

$$h^\circ = \arctang (b^* / a^*) \quad (3)$$

Para as medições, 10 mL dos néctares foram colocados em uma placa de vidro transparente de 90 cm de diâmetro, sendo os valores de L\*, a\* e b\* para cada amostra, fornecidos a partir da leitura sobre a placa de vidro contendo o néctar.

### 3.2.5 Determinação dos Ácidos Lático e Acético no Néctar

Os teores de ácidos orgânicos no néctar foram determinados nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento à  $4 \pm 1$  °C do produto. Para a análise de ácidos lático e acético, as amostras foram preparadas de acordo com metodologia proposta por Donkor et al. (2005) e Cruz et al. (2010) com algumas modificações. Foram adicionados 0,2 mL de ácido nítrico 15,5 M e 2 mL de água deionizada em 6 mL de amostra. A mistura foi centrifugada em centrífuga Combi – 514R (Hanil Science Industrial CO., Ltd.) a 785 g por 20 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22 µm e analisado por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) utilizando-se cromatógrafo (THERMO mod. ACCELLA PDA). A detecção dos compostos foi realizada por detector UV-Vis com comprimento de onda fixado em 210 nm. O tempo total da análise foi de 20 minutos.

### 3.2.6 Viabilidade das Culturas Probióticas no Néctar

Para a enumeração de *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* BGP1, as amostras do néctar foram diluídas em solução salina peptonada (0,85 % de NaCl e 0,1 % de peptona) e semeadas em profundidade (*pour-plate*) em Agar MRS (Synth, Brasil). As placas de petri foram incubadas em jarra de aneroiose (Anaerobac da Probac®) a 37 °C por 72 horas (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000; ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004), sendo posteriormente realizada a contagem e determinado o Log UFC.mL<sup>-1</sup> de néctar. A viabilidade celular foi avaliada nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento do néctar à  $4 \pm 1$  °C.

### 3.2.7 Resistência Gastrointestinal *in vitro* das Culturas Probióticas Adicionadas ao Néctar

A análise foi conduzida empregando-se um modelo *in vitro*, por meio da simulação de sucos gástricos e entéricos e enzimas do trato gastrointestinal, adaptado de Liserre et al. (2007) e Buriti; Castro; Saad (2010), com alterações conforme descrito a seguir.

Decorridos os tempos de armazenamento de 1, 7, 14, 21 e 28 dias à temperatura de  $4 \pm 1$  °C, alíquotas de 10 mL do néctar contendo a cultura probiótica foram homogeneizadas em 90 mL de solução de NaCl 0,5 %. Para a

realização dos ensaios de resistência *in vitro* simulando a fase gástrica, retirou-se 10 mL da diluição anterior em 3 frascos erlenmeyers de 125 mL e adicionou-se 3 g/L de pepsina (pepsin from porcine stomach mucosa, Sigma-Aldrich) e 0,9 mg/L de lipase (amano lipase from *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich), respectivamente. Em seguida, ajustou-se o pH para 2,3 - 2,6 com HCl 1 N e incubou-se a 37 °C/2 h sob agitação de 150 rpm em banho-maria (Gyratory Water Bath Shaker G76D, New Brunswick Scientific CO, Inc. N. J., U.S.A.).

Após 2 horas, para simular o intestino delgado, ajustou-se o pH para 5,4 - 5,7, utilizando solução de fosfato de sódio pH 12 (150 mL de NaOH 1 N; 14 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O e aferir com água destilada para 1 L) contendo bile (bovine bile, Sigma-Aldrich) e de pancreatina (pancreatin form porcine pâncreas, Sigma-Aldrich) na proporção de 5 g/L e 1,6 g/L, respectivamente. Reincubou-se a 37 °C / 2 h sob agitação. Após 4 horas, para simular o intestino grosso, ajustou-se o pH para 6,8 - 7,2 utilizando a solução de fosfato de sódio pH 12 contendo de bile (7,95 g/L) e pancreatina (0,79 g/L). Reincubou-se a 37 °C / 2 h sob agitação, totalizando 6 horas de ensaio.

Ao término de cada fase (2, 4 e 6 h) alíquotas de 1 mL foram retiradas e submetidas a diluições decimais em solução de NaCl 0,5 % com plaqueamento por profundidade em Agar MRS (Synth, Brasil). As placas de petri foram incubadas em jarras de anaerobiose (Anaerobac da Probac<sup>®</sup>) a 37 °C por 72 horas e posteriormente realizada a contagem para a determinação do Log UFC.mL<sup>-1</sup> de néctar.

Os valores de pH de cada amostra em cada fase do ensaio foram monitorados utilizando pHmetro HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 9321.

### **3.2.8 Avaliação Sensorial dos Néctares**

Para realizar a avaliação sensorial o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, conforme parecer no Anexo 1. As quatro amostras de néctar, no 28º dia de armazenamento à 4 ± 1 °C, foram codificadas com números aleatórios de três dígitos e apresentadas aos julgadores, de forma sequencial em copos plásticos de 50 mL a 8 °C. O teste de aceitação foi realizado por 76 julgadores não treinados, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos com termos

variando do “desgostei extremamente” (escore 1) a “gostei extremamente” (escore 9) para a impressão global, segundo Minin (2010).

### **3.2.9 Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5 % de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando-se do programa estatístico *BioEstat 5.0*.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Avaliação do pH, Acidez e Cor do Néctar

Os valores médios de pH e acidez durante o armazenamento dos néctares à temperatura de  $4 \pm 1$  °C são mostrados na Tabela 1.

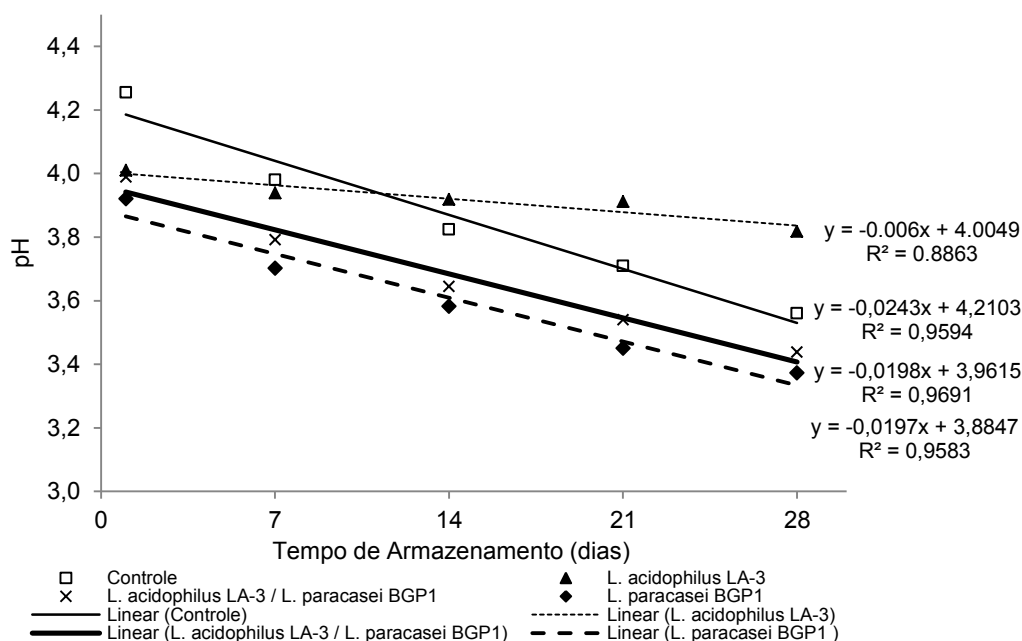
**TABELA 1:** Valores médios de pH e acidez de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas.

Tempo de Armazenamento (dias)	pH				Acidez (% ácido láctico)			
	Controle	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	Controle	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
1	4,26 ±	4,01 ±	3,92 ±	3,99 ±	0,44 ±	0,53 ±	0,54 ±	0,52 ±
	0,07 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>
7	3,98 ±	3,94 ±	3,70 ±	3,79 ±	0,52 ±	0,55 ±	0,69 ±	0,64 ±
	0,13 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>
14	3,82 ±	3,92 ±	3,58 ±	3,64 ±	0,65 ±	0,56 ±	0,80 ±	0,78 ±
	0,27 <sup>a,c</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b,c</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,07 <sup>a,b</sup>
21	3,71 ±	3,91 ±	3,45 ±	3,54 ±	0,70 ±	0,56 ±	0,93 ±	0,84 ±
	0,32 <sup>a,b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a,c</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b,c</sup>
28	3,56 ±	3,82 ±	3,37 ±	3,44 ±	0,78 ±	0,58 ±	1,06 ±	0,92 ±
	0,32 <sup>a,b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a,c</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b,c</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão. <sup>a,b</sup> Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si a nível de 5 % de probabilidade ( $p > 0,05$ ) para o tipo de tratamento. T<sub>1</sub> = *L. acidophilus* LA-3; T<sub>2</sub> = *L. paracasei* BGP 1; T<sub>3</sub> = *L. acidophilus* LA-3/*L. paracasei* BGP 1.

Tanto o pH quanto a acidez apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) a partir do primeiro dia de armazenamento. Com relação ao pH, os tratamentos com adição das culturas probióticas, apresentaram diminuições consideráveis, durante todo o período avaliado, com exceção do T<sub>1</sub> que não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao controle a partir do 7º dia. Apesar do T<sub>1</sub> apresentar uma redução mais lenta de pH, verificou-se a influência do tempo ( $p > 0,05$ ) sobre esse parâmetro (Figura 1).

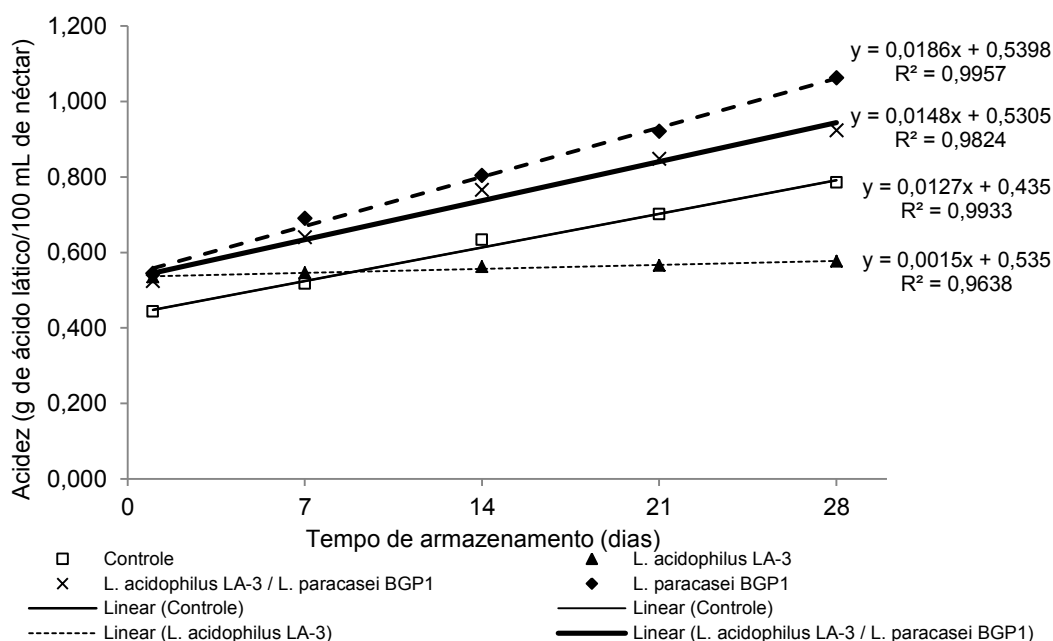
O mesmo comportamento foi observado para a acidez titulável, que apresentou aumento significativo no decorrer das 4 semanas de armazenamento (Figura 2). Entretanto, verifica-se que no tratamento T<sub>1</sub> os valores exibidos são menores.



**FIGURA 1:** Variação do pH de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas.

Essa diminuição no pH, associada a uma acidez aumentada, é comumente observada e está relacionada à produção e acúmulo de metabólitos primários como os ácidos láctico e acético e secundários como os compostos antimicrobianos como ácido fórmico, benzóico e bacteriocinas, resultantes da fermentação de carboidratos pelas culturas probióticas (FARNWORTH et al., 2007; WANG, 2009; MOHRAN et al., 2013). Além disso, de acordo com Wang (2009), a proteína de soja tem uma baixa capacidade de tamponamento, devido à composição e propriedades físico-químicas da proteína de soja, o que provavelmente contribuiu para a redução do pH dos néctares no presente estudo.

O ácido láctico produzido pelas culturas probióticas durante a fermentação pode causar a redução do pH, resultando em alteração na homeostase e inibição da multiplicação de diferentes microrganismos patogênicos (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp.) e deteriorantes (*Pseudomonas* spp.) (DIFTIS; BILIADERIS; KIOSSEOGLU, 2005). Possivelmente, a diminuição do pH contribuiu para a conservação do produto desenvolvido neste trabalho, uma vez que este não é adicionado de conservantes.



**FIGURA 2:** Variação da de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas.

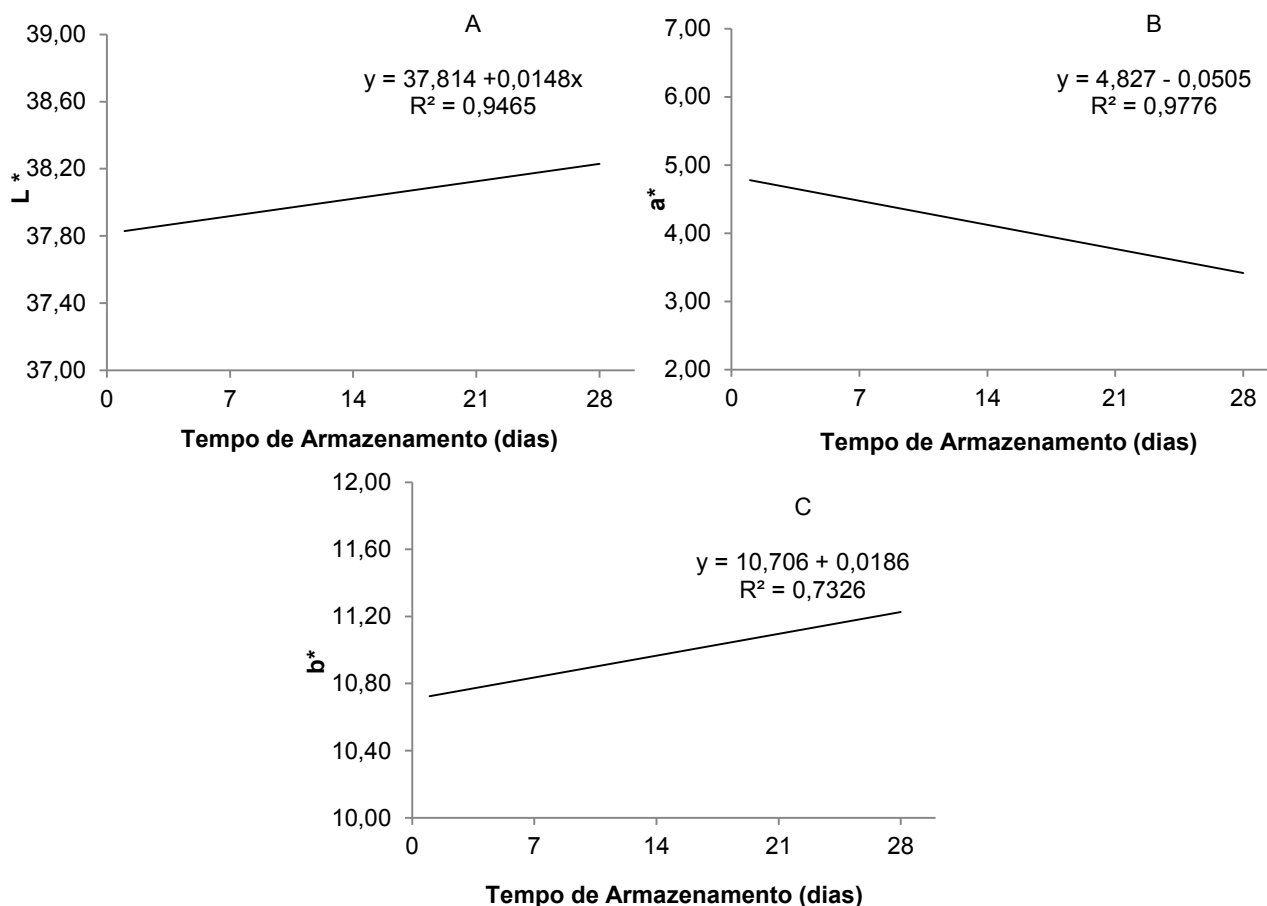
Na Tabela 2 são mostrados os parâmetros avaliados para a cor dos néctares a base de cupuaçu. Verifica-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados. Porém, verificou-se que o tempo foi significativo ( $p < 0,05$ ) para  $L^*$  sugerindo que durante os 28 dias de armazenamento, houve melhoria na aparência das bebidas através do incremento na luminosidade ou brilho superficial (Figura 3A).

**TABELA 2:** Resultados médios dos parâmetros de cor em néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas.

Tratamentos	$L^*$	$a^*$	$b^*$	IC	$c^*$	$h^o$
Controle	$37,89 \pm 0,34^a$	$3,30 \pm 0,97^a$	$10,99 \pm 0,22^a$	$8,12 \pm 2,41^a$	$11,54 \pm 0,10^a$	$73,88 \pm 4,77^a$
T <sub>1</sub>	$38,06 \pm 0,08^a$	$3,54 \pm 1,06^a$	$11,20 \pm 0,23^a$	$8,33 \pm 2,55^a$	$11,85 \pm 0,08^a$	$72,30 \pm 5,37^a$
T <sub>2</sub>	$38,18 \pm 0,14^a$	$3,49 \pm 1,06^a$	$11,12 \pm 0,25^a$	$7,81 \pm 2,59^a$	$11,60 \pm 0,14^a$	$73,52 \pm 5,23^a$
T <sub>3</sub>	$38,27 \pm 0,25^a$	$3,48 \pm 1,14^a$	$11,15 \pm 0,30^a$	$8,18 \pm 3,03^a$	$11,81 \pm 0,17^a$	$72,73 \pm 6,08^a$

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a,b</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si a nível de 5 % de probabilidade para o tipo de tratamento. T<sub>1</sub> = *L. acidophilus* LA-3; T<sub>2</sub> = *L. paracasei* BGP 1; T<sub>3</sub> = *L. acidophilus* LA-3/ *L. paracasei* BGP 1

Para os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  também verificou-se a influencia do tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ), havendo uma diminuição dos valores de  $a^*$  (Figura 3B), que tende ao verde, e aumento dos valores de  $b^*$  (Figura 3C), que tende ao amarelo. Pereira; Maciel; Rodrigues (2011), ao avaliarem uma bebida probiótica a partir de suco de caju fermentado com *Lactobacillus casei*, também observaram a diminuição do componente de cor  $a^*$  e aumento do do  $b^*$  durante o armazenamento do suco por 42 dias.



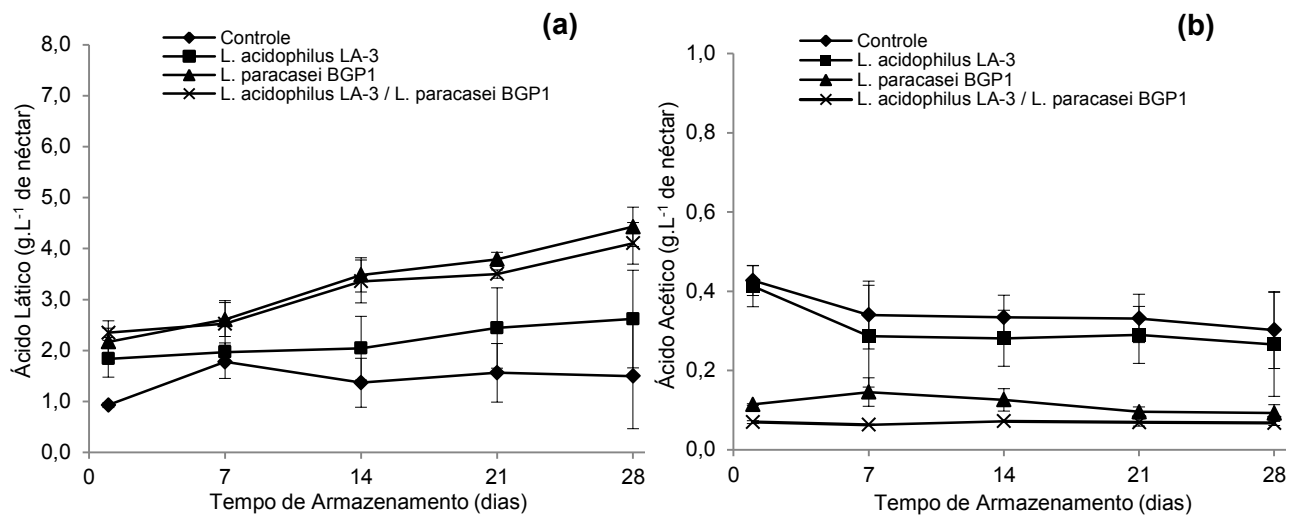
**FIGURA 3:** Variação das coordenadas  $L^*$  (A),  $a^*$  (B) e  $b^*$  (C) de néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionados de culturas probióticas e armazenados à  $4 \pm 1$  °C por 28 dias.

O índice de cor (IC) varia entre -20 a +20, sendo que os valores de IC inferiores a -7 expressam uma coloração verde, aumentando em intensidade com valores mais negativos. Valores compreendidos entre -7 e +7 expressam tonalidades que compreendem o verde amarelado (entre -7 e 0) e laranja pálido (entre 0 e +7). Os valores superiores a +7 expressam colorações laranja, que aumentam em intensidade com o aumento do IC (JIMENEZ-CUESTA ET al., 1983). Neste trabalho, o IC não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, assim como não foi influenciado pelo tempo de armazenamento.

Ainda em relação a cor, também avaliou-se o índice Chroma ( $c^*$ ) que denota a intensidade da cor e o ângulo Hue ( $h^\circ$ ) representando a tonalidade. O  $h^\circ$  é expresso em graus, sendo que  $0^\circ$  corresponde a vermelho,  $90^\circ$  a amarelo,  $180^\circ$  a verde e  $270^\circ$  a azul (TIBOLA et al., 2005). Verificou-se neste trabalho que tanto o  $c^*$  quanto o  $h^\circ$  não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e não foram influenciados pelo tempo de armazenamento, apresentando valores médios de 11,70 e 73,  $11^\circ$  (Tabela 2), respectivamente.

### 3.3.2 Ácidos Lático e Acético no Néctar

A atividade metabólica das culturas probióticas nas bebidas foi monitorada quantificando os seus principais produtos metabólicos, os ácidos lático e acético (Figura 4 e 5). Como pode-se observar, a produção de ácido lático foi mais abundante em relação ao acético, alcançando o mais alto nível de 4,43 e 4,10  $\text{g.L}^{-1}$  para *L. paracasei* BGP1 e mistura *L. acidophilus* LA-3/ *L. paracasei* BGP1, respectivamente, após 28 dias de armazenamento. Já a quantidade sintetizada na bebida com *L. acidophilus* LA-3 foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) durante todo o período de armazenamento à  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , assim como no tratamento controle, que apresentou somente no 7º dia um aumento ( $p < 0,05$ ) no nível desse ácido.



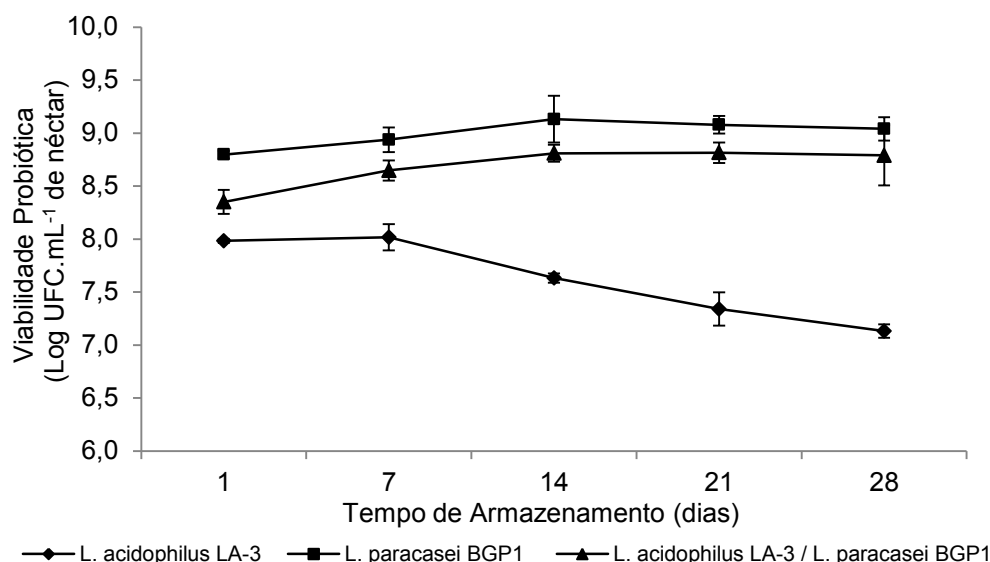
**FIGURA 4:** Concentração dos ácidos láctico (a) e acético (b) em néctares a base de cupuaçu e proteína de soja adicionado de culturas probióticas durante o armazenamento à  $4 \pm 1$  °C. Os resultados são médias de duas repetições  $\pm$  desvio padrão.

A produção de ácido é uma característica desejada para esse tipo de bebida, pois quando a produção de ácido acético é superior ao ácido láctico, pode causar um sabor desagradável no produto, o que não foi observado. A produção de ácidos em bebidas fermentadas contendo soja pode variar em função das culturas utilizadas e substratos adicionados na fermentação, podendo apresentar maiores concentrações de ácido acético em relação ao láctico (WANG, 2002; YEO; LIONG, 2010; DONKOR, 2007a). Portanto, as condições utilizadas nesse trabalho foram adequadas para obtenção de um produto final com um sabor mais agradável.

De uma forma geral as maiores concentrações de ácido láctico foram obtidas para os tratamentos T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, que apresentaram maior viabilidade (Figura 5).

### 3.3.3 Viabilidade das Culturas Probióticas Durante 28 Dias de Armazenamento à $4 \pm 1$ °C

A viabilidade das culturas probióticas é de fundamental importância para que seja possível a verificação quanto à legislação em vigor. Todas as culturas probióticas adicionadas nos néctares a base de cupuaçu e proteína de soja permaneceram viáveis durante 28 dias de armazenamento como esta mostrado a Figura 5.



**FIGURA 5:** Viabilidade das culturas probióticas nos néctares a base de cupuaçu e proteína de soja armazenados à  $4 \pm 1$  °C por 28 dias.

A viabilidade de *L. acidophilus* LA-3 no néctar manteve-se em  $8,0 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  do primeiro ao 7º dia de armazenamento. Após o 7º dia de armazenamento sob refrigeração, a viabilidade de *L. acidophilus* LA-3 reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ), no entanto, essa redução foi menor que 1 ciclo logarítmico, apresentando no 28º dia uma contagem de  $7,13 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ .

Nazzaro et al. (2009) avaliaram a capacidade do *L. acidophilus* encapsulado e *L. acidophilus* livre sobreviver por 8 semanas a 4 °C em suco de cenoura. A encapsulação de células aumentou significativamente a viabilidade após a fermentação e armazenamento com valores de  $10,6 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ , enquanto que as células livres alcançaram valores de  $8,3 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ .

Buriti; Castro; Saad (2010) também verificaram que *mousses* de goiaba contendo *L. acidophilus* LA-5, suplementados com proteínas do soro de leite apresentaram viabilidade variando de  $7,77 - 6,24 \text{ Log UFC. g}^{-1}$ , durante 28 dias de armazenamento à  $4 \pm 1$  °C.

Valores acima de  $6 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  atendem ao recomendado pela legislação brasileira, a qual preconiza que um produto com alegações probióticas deve conter na recomendação diária do produto pronto para consumo, uma faixa de 8 – 9 Log UFC (BRASIL, 2008). Assim, o consumo diário de pelo menos 200 mL do néctar, oferece ao consumidor quantidade suficiente de bactérias probióticas para promover efeitos benéficos para a saúde intestinal (AKALIN et al., 2007; BURNS et al., 2008.)

Champagne; Gardner (2008) apontaram maiores perdas na viabilidade de *L. acidophilus* em relação a *L. rhamnosus* ao avaliarem durante 35 dias o efeito do armazenamento a 4 °C em sucos de frutas (abacaxi, maçã, laranja, pêra, maracujá e limão). Os autores também constataram que *L. acidophilus* apesar de apresentar menor estabilidade nos sucos durante o armazenamento, demonstrou a maior resistência ao estresse gastrointestinal na fase gástrica, assim como o observado neste estudo (Tabela 4).

Por outro lado, *L. paracasei* BGP1 e a mistura de *L. acidophilus* LA-3/ *L. paracasei* BGP1 mantiveram a viabilidade ( $p > 0,05$ ) durante as quatro semanas de armazenamento com valores médios de 8,99 e 8,65 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Pimentel; Prudencio; Rodrigues (2011), ao desenvolverem um néctar de pêssigo potencialmente simbiótico por meio da adição de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* como cultura probiótica e inulina como prebiótico verificaram contagens superiores a 7 Log UFC.mL<sup>-1</sup> durante 28 dias à 4 ± 1 °C.

Sheehan; Ross; Fitzgerald (2007) avaliaram a sobrevivência de *Lactobacillus* em sucos de laranja, abacaxi e cranberry, e observaram que todas as estirpes sobreviveram por mais tempo em suco de laranja e abacaxi em comparação com cranberry. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* apresentaram contagens acima de 7 Log UFC.mL<sup>-1</sup> em suco de laranja e abacaxi, respectivamente, por um período de 12 semanas de armazenamento a 4 °C.

Em contrapartida, a baixa viabilidade de culturas probióticas em sucos de frutas foi encontrada em outros estudos (DING; SHAH, 2008; MOUSAVI et al., 2011) e diferentes alternativas vêm sendo utilizadas para superar os problemas de sobrevivência desses microrganismos, incluindo seleção de culturas resistentes à acidez (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007); microencapsulação dos probióticos (NUALKAEKUL et al., 2012; YING et al., 2013) e adição de prebióticos (GODERSKA, CZARNECKA; CZARNECKI, 2007).

### 3.3.4 Sobrevivência das Culturas Probióticas em Condições Gastrointestinais *in vitro*

Na Tabela 4 está representada a sobrevivência de *L. acidophilus* LA-3, *L. paracasei* BGP 1 e sua mistura (*L. acidophilus* LA-3/ *L. paracasei* BGP 1) em néctar a base de cupuaçu e proteína de soja armazenado por 28 dias à  $4 \pm 1$  °C.

**TABELA 4:** Sobrevivência das culturas probióticas (Log UFC.mL<sup>-1</sup>) em néctar a base de cupuaçu e proteína de soja, submetidas a resistência gastrointestinal *in vitro*, durante o período de armazenamento à  $4 \pm 1$  °C.

Tratamento	Tempo de Armazenamento (dias)	Tempo de simulação <i>in vitro</i> (horas)			
		0	2	4	6
T <sub>1</sub>	1	7,98 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	7,42 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	4,35 ± 0,09 <sup>Ab</sup>	4,70 ± 0,18 <sup>Ab</sup>
	7	8,04 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	7,44 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	4,57 ± 0,12 <sup>Ac</sup>	4,65 ± 0,04 <sup>Ac</sup>
	14	7,62 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	6,97 ± 0,03 <sup>Ab</sup>	3,30 ± 0,00 <sup>Ac</sup>	4,29 ± 0,02 <sup>Ad</sup>
	21	7,34 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	6,40 ± 0,09 <sup>Ab</sup>	3,17 ± 0,09 <sup>Ac</sup>	3,96 ± 0,34 <sup>Ad</sup>
	28	7,13 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	5,95 ± 0,18 <sup>Ab</sup>	3,22 ± 0,16 <sup>Ac</sup>	3,35 ± 0,04 <sup>Ac</sup>
T <sub>2</sub>	1	8,79 ± 0,04 <sup>Ba</sup>	5,25 ± 0,31 <sup>Bb,c</sup>	4,73 ± 0,11 <sup>Ab</sup>	5,57 ± 0,32 <sup>Ac</sup>
	7	8,96 ± 0,12 <sup>Ba</sup>	5,63 ± 0,20 <sup>Bb,c</sup>	5,43 ± 0,08 <sup>Bb</sup>	6,21 ± 0,36 <sup>Bc</sup>
	14	9,10 ± 0,22 <sup>Ba</sup>	5,98 ± 0,04 <sup>Bb</sup>	5,63 ± 0,02 <sup>Bc</sup>	6,38 ± 0,04 <sup>Bd</sup>
	21	9,09 ± 0,08 <sup>Ba</sup>	6,52 ± 0,03 <sup>Ab</sup>	5,50 ± 0,50 <sup>Bc</sup>	6,26 ± 0,03 <sup>Bb,c</sup>
	28	9,04 ± 0,11 <sup>Ba</sup>	5,70 ± 0,44 <sup>Ab</sup>	5,79 ± 0,08 <sup>Bb</sup>	6,13 ± 0,17 <sup>Bb</sup>
T <sub>3</sub>	1	8,35 ± 0,11 <sup>Ca</sup>	4,80 ± 0,18 <sup>Bb</sup>	4,57 ± 0,40 <sup>Ab</sup>	5,03 ± 0,31 <sup>Ab</sup>
	7	8,63 ± 0,09 <sup>Ca</sup>	5,32 ± 0,05 <sup>Bb</sup>	5,19 ± 0,03 <sup>Bb</sup>	5,76 ± 0,19 <sup>Bc</sup>
	14	8,80 ± 0,08 <sup>Ba</sup>	5,88 ± 0,03 <sup>Bb</sup>	5,68 ± 0,16 <sup>Bb</sup>	5,33 ± 0,52 <sup>Cb</sup>
	21	8,82 ± 0,10 <sup>Ba</sup>	5,63 ± 0,39 <sup>Bb</sup>	5,42 ± 0,13 <sup>Bb</sup>	5,10 ± 0,26 <sup>Cb</sup>
	28	8,79 ± 0,28 <sup>Ca</sup>	5,92 ± 0,07 <sup>Ab</sup>	4,85 ± 0,66 <sup>Bb</sup>	5,35 ± 0,28 <sup>Cb</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão. <sup>A,B</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) para o tipo de tratamento no mesmo dia de armazenamento. <sup>a,b</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) para o tempo de simulação *in vitro*. T<sub>1</sub> = *L. acidophilus* LA-3; T<sub>2</sub> = *L. paracasei* BGP 1; T<sub>3</sub> = *L. acidophilus* LA-3/ *L. paracasei* BGP 1.

As populações das culturas probióticas decresceram significativamente ( $p < 0,05$ ) após as duas horas iniciais do ensaio *in vitro*, para todos os tratamentos em todos os tempos de armazenamento, com exceção do tratamento T<sub>1</sub> no primeiro dia, que apresentou uma redução de 0,5 ciclo logarítmico. Aliás, nessa fase, verifica-se que o tratamento T<sub>1</sub> apresentou resultados significativamente superiores de sobreviventes até o 14º dia de armazenamento. O T<sub>2</sub> e o T<sub>3</sub> alcançaram valores semelhantes somente no 21º

e 28º dia, respectivamente. Os valores médios de redução para o T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> foram de 3,0 ciclos logarítmicos durante o período avaliado.

A fase gástrica é considerada crítica para os microrganismos probióticos atingirem o intestino humano e lá se multiplicarem (MORELLI, 2007). Muitos autores atribuem a diminuição da viabilidade celular de probióticos submetidos a resistência *in vitro* a danos causados pelo pH baixo (LISERRE et al., 2007; BOTES et al., 2008; THANTSHA et al., 2009). Entretanto, a manutenção da viabilidade em condições ácidas observada no T<sub>1</sub> pode ser atribuída a presença da pepsina, pois segundo Schillinger et al. (2005) estirpes de *L. acidophilus* e *L. johnsonii* foram mais tolerantes ao suco gástrico simulado contendo pepsina, quando comparados as estirpes de *L. paracasei* e *L. rhamnosus*.

Essa diferença na viabilidade entre os tratamentos na primeira fase de simulação também pode estar relacionada ao fato do *L. acidophilus* ser uma bactéria hidrofóbica (KOS et al., 2003), assim, como a formulação do néctar é composta por 2,5 g de proteínas de soja e, esses compostos apresentarem características anfipáticas, poderiam, segundo Schär-ammaretti; Ubbink (2003), levar a uma adesão específica à superfície da célula através do lado hidrofóbico, enquanto o lado hidrofílico, exposto em direção a fase aquosa, poderia provalmente determinar a resistência observada ao suco gástrico.

Após a redução na fase gástrica, observou-se a manutenção das populações após 4 horas de ensaio, fase que simula o intestino delgado para T<sub>3</sub> em todo o período e para T<sub>2</sub> no 1º, 7º e 28º dia. Entretanto, para T<sub>1</sub> observou-se uma diminuição elevada dos sobreviventes durante o armazenamento à 4 ± 1 °C dos néctares.

Já na fase que simula o intestino grosso observou-se a manutenção da viabilidade entre as duas fases entéricas simuladas para a maioria dos períodos de armazenamento. Entretanto, para T<sub>1</sub> no 14º e 21º dia, T<sub>2</sub> no 1º, 7º e 14º dia, e T<sub>3</sub> no 7º dia, foi observada a recuperação das culturas, com um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na sobrevivência.

Ao final da simulação *in vitro* verificou-se que o tratamento T<sub>2</sub> obteve o melhor desempenho, com os maiores valores de populações, ao contrário de T<sub>1</sub>.

Como pode-se perceber, as culturas probióticas não encapsuladas são muito instáveis em matrizes vegetais. Blaiotta et al. (2013) avaliaram o efeito do proteína com fibra não digerível de castanha (*Castanea sativa* Mill.) sobre a viabilidade de estirpes probióticas de *Lactobacillus* em condições simuladas do trato gastrointestinal, e verificaram que todas as estirpes, com exceção de *L. rhamnosus* VT1, mostraram um comportamento idêntico, com níveis populacionais inalterados até 180 minutos. Os autores concluíram que a fibra melhorou significativamente a tolerância, principalmente, na fase entérica, enquanto que o efeito protetor na fase gástrica foi atribuído a composição de peptídeos.

Ainda em relação a sobrevivência e viabilidade dos microrganismos probióticos, Corcoran et al (2005) descobriram que a glicose aumentou a sobrevivência de lactobacilos em condições ácidas e Mainville; Arcand; Farnworth (2005) relatam que o procedimento de simulação da fase gástrica em níveis de pH entre 1,5 e 2,5 superestimam reais perdas de viabilidade gástrica devido a capacidade tamponante de certos alimentos.

A resistência de microrganismos probióticos à ação dos sais biliares, ácido clorídrico e demais enzimas envolvidas no processo digestivo é um importante pré requisito para sua inserção em uma matriz alimentar. No Brasil, a documentação referente à comprovação de eficácia de um microrganismo probiótico exige a inclusão de testes de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (BRASIL, 2008). Dessa forma, é de grande importância a avaliação dos efeitos dos processos digestivos na sobrevivência das culturas probióticas nos néctares desenvolvidos neste trabalho.

### 3.3.5 Aceitabilidade Sensorial dos Néctares

Os dados da avaliação das amostras de néctar a base de cupuaçu e proteína de soja, adicionado de culturas probióticas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o resultado está apresentado na Tabela 5.

**TABELA 5:** Médias de escores para a o teste de aceitação dos néctares.

Tratamento	Média	DMS - Tukey
Controle	5,8 <sup>a</sup>	
T <sub>1</sub>	6,3 <sup>a</sup>	0,55
T <sub>2</sub>	4,7 <sup>b</sup>	
T <sub>3</sub>	5,0 <sup>b</sup>	

<sup>a,b</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) para o tipo de tratamento.

T<sub>1</sub> = *L. acidophilus* LA-3; T<sub>2</sub> = *L. paracasei* BGP 1; T<sub>3</sub> = *L. acidophilus* LA-3/ *L. paracasei* BGP 1

Verificou-se que houve diferença significativa entre os néctares, sendo que o tratamento controle (sem probiótico) e T<sub>1</sub> não diferiram entre si, sendo os mais aceitos pelos julgadores. O néctar controle apresentou escore médio situando-se entre os termos hedônicos “indiferente” e “gostei ligeiramente”. Já o néctar contendo *L. acidophilus* LA-3, apesar de apresentar-se significativamente igual ao controle, situou-se entre os termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei muito”.

A adição de culturas probióticas em alimentos contendo soja tem sido bem correlacionada com a melhoria das características sensoriais devido a fermentação reduzir o sabor característico da soja (MONDRAGON-BERNAL et al., 2010), porém, Donkor et al. (2007a), relataram que um iogurte probiótico a base de soja contendo *L. acidophilus* LAFTI L10, *L. casei* LAFTI L26 e *B. animalis ssp. lactis* LAFTI B94, foi menos aceito pelos julgadores em relação ao iogurte controle sem probióticos.

Os menores escores observados no tratamento controle, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, podem estar relacionados a elevada acidez dos néctares (Tabela 1), uma vez que, muitos julgadores relataram, na ficha de avaliação, essa característica das bebidas.

### 3.4. CONCLUSÃO

O néctar de cupuaçu e proteína de soja mostrou-se um substrato promissor na veiculação das culturas probióticas de *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* BGP1. Todos os tratamentos contendo essas bactérias apresentaram populações dentro do recomendado pela legislação durante todo o período de armazenamento à  $4 \pm 1$  °C. Além disso, em testes *in vitro* para verificar a influência desta matriz vegetal na sobrevivência durante o trânsito gastrointestinal obteve-se contagens relativamente elevadas comparada à literatura encontrada.

Os resultados indicam que o néctar de cupuaçu adicionado de proteína de soja pode ser usado como um produto alimentar funcional adequado para consumidores em geral, sobretudo aqueles que não consomem derivados lácteos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALIN, A. S.; GÖNÇ, S.; ÜNAL, G.; FENDERYA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M222 - M227, 2007.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. In Fruits Juices. 16<sup>th</sup> edition, v. II, Maryland: AOAC International, 1997.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; LEPERA, J. S.; WANG, C. C.; VALDEZ, G. F. Efeito do consumo de um novo produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio sobre o tecido ósseo de ratas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, p. 146 - 152, 2006.

BLAIOTTA, G.; LA GATTA, B.; DI CAPUA, M.; DI LUCCIA, A.; COPPOLA, R.; APONTE, M. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. **Food Microbiology**, v. 36, p. 161 - 169, 2013.

BOTES, M.; VAN REENEN, C. A.; DICKS, L. M. T. Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 326 - 370, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de dezembro de 2003. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9058#>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Atualizado em julho de 2008. IX – **Lista das alegações de propriedades funcionais aprovadas**. [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm).

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121 - 129, 2010.

BURNS, P.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D.; VINDEROLA, G. C.; REINHEIMER, J. A.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E. Probiotic crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 500 - 512, 2008.

CHEN, H.; LI-JUN, L.; JIAN-JUN, Z.; BO, X.; RUI, L. Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1633 - 1636, 2010.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3060 - 3067, 2005.

CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; CADENA, R. F.; FARIA, J. A. F.; BOLINI H. M. A.; PINHEIRO, H. P.; SANT'ANA, A. S. Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. **Food Research International**, v. 43, p. 1444 - 1448, 2010.

DANYANG YING, D. Y.; SCHWANDER, S.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; GANTENBEIN-DEMARCHI, C.; AUGUSTIN. M. A. *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 98 - 105, 2013.

DIFTIS, N. G.; BILIADERIS, C.G.; KIOSSEOGLOU, V. D. Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate-dextran mixture. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 1025 - 1031, 2005.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 2, p. 219 - 232, 2008.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yoghurt. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 375 - 381, 2005.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yoghurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9868 - 9876, 2007a.

DONKOR, O. N.; NILMINI, S. L. I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 657 - 665, 2007b.

EUFRÁSIO, M. R.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R, V.; ABREU, W. C.; LIMA, M. A. C.; PEREIRA, M. C. A. Efeito de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 6, p. 1608 - 1614, 2009.

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

FREITAS, D. D. C.; JACKIX, M. N. H. Effect of a beverage with added fructooligosaccharide and pectin on the cholesterol level and stimulation of bifidobacteria in hypercholesterolemic hamsters. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n.1, p. 81 - 86, 2005.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of *Bifidobacterium Bb-12* and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 621 - 627, 2010.

GODERSKA, K.; CZARNECKA, M.; CZARNECKI, Z. Effect of prebiotic additives to carrot juice on the survivability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* bacteria. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 57, n. 4, p. 427 - 432, 2007.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. **Journal of Applied Science**. v .8, n. 2, p. 379 - 382, 2008.

JIMENEZ-CUESTA, M.; CAYUELA J.C.; MARTINEZ-JAVEGA, J.M. Teoria y practica de la desverdizacion de los citricos. **Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentacion - I.N.I.A.**, 1983.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT e Food Science and Technology**, v. 39, p. 1221 - 1227, 2006.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S.; IMPRAGA, M. S.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 981 - 987, 2003.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate–chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, p. 1–16, 2007.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. A dynamic model that simulates the upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 287 - 296, 2005.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, J. M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, p. 764 - 770, 2013.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudo com Consumidores**. 3 ed. Viçosa, MG: UFV, 2013.

MOHAN, G.; GUHANKUMAR, P.; KIRUTHTHICA, V.; SANTHIYA, N.; ANITA, S. Probiotication of fruit juices by *Lactobacillus acidophilus*. **International**

**Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 4, n. 1, p. 72 - 77, 2013.

MOTA, D. M.; SCHMITZ, H.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Atores, canais de comercialização e consumo da mangaba no nordeste brasileiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 1, p. 121 - 143, 2008.

MOUSAVI, Z. E., MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H.; EMAM-DJOMEH, Z.; KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 123 - 128, 2011.

NICOLESCO, C. L.; BURULEANU, L. C. Correlation of some substrate parameters in growing *Lactobacillus acidophilus* on vegetable and fruit cocktail juices. **Bulletin UASVM Agriculture**, v. 67, p. 352–359, 2010.

NUALKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1281 – 1287, 2012.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, p. 1276–1283, 2011.

PIEIDADE, J.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e de pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sanguíneo em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 149 - 156, 2003.

PIMENTEL, T. C.; PRUDENCIO, S. H.; RODRIGUES, R. S. **Néctar de pêsego potencialmente simbiótico**. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 22, n. 3, p. 455 - 464, 2011.

SAW, L. K.; CHEN, S.; WONG, S. H.; TAN, S. A.; GOH, K. K. T. Fermentation of tropicalfruit juices by lactic acid bacteria. **12 th ASEAN Food Conference**, 16–18 June, Bangkok, Thailand (p. 80–87), 2011.

SCHÄR-ZAMMARETTI, P.; UBBINK, J. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 6, p. 4076 - 4092, 2003.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1289 - 1297, 2005.

SHEEHAN, V. M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 279 - 284, 2007.

THANTSHA, M. S.; CLOETE, T. E.; MOOLMAN, F. S.; LABUSCHAGNE, P. W. Supercritical carbon dioxide interpolymer complexes improve survival of *B. longum* Bb-46 in simulated gastrointestinal fluids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 88 - 92, 2009.

TIBOLA, C.S.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M.R.; SILVA, P.R.; FERRI, V. C.; ROMBALDI, C.V. Inibição da ação do etileno na conservação de caquis (*Diospyros kaki* L.) 'Fuyu'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 36 - 39, 2005.

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

VRIESMANN, L.C.; PETKOWICZ, C. L. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 72 - 79, 2009.

XIAO, C. W. Health effects of soy protein and isoflavones in human. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1244S - 1249S, 2008.

YEO, S. K.; LIONG, M. T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 267 - 275, 2010.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 674 - 679, 2004.

**4. CAPÍTULO 3 - NÉCTAR DE CUPUAÇU E SOJA ADICIONADO DE PROBIÓTICO: EFEITOS *IN VIVO* EM RATOS *Wistar* INDUZIDOS A LESÕES PRÉ NEOPLÁSICAS**

## RESUMO

Estudos têm mostrado a viabilidade da utilização de microrganismos probióticos em matrizes não lácteas como sucos de frutas, a fim de fornecer ao consumidor alimentos funcionais, isentos de colesterol, lactose e substâncias alergênicas presentes nas bases lácteas. Objetivou-se neste estudo investigar os efeitos da ingestão de bebida a base de polpa de cupuaçu e proteína de soja adicionada de probióticos no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos *Wistar*. Os animais foram alimentados com dieta comercial e receberam diariamente, via gavagem, o néctar desenvolvido na quantidade de 3 mL/kg de peso/dia, durante um período de 10 semanas. Como agente indutor da lesão pré neoplásica de cólon foi utilizada a 1,2 - dimetilhidrazina. Durante o período experimental, coletou-se as fezes frescas dos animais para as determinações do pH e *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Ao final do experimento, após a eutanásia, amostras de sangue, fezes do ceco, fígado e o cólon foram preparadas para as determinações séricas, de ácidos graxos voláteis, índice hepatossomático e quantificação de Focos de Criptas Aberrantes (FCA), respectivamente. Os resultados sugerem que a ingestão do néctar probiótico não exerceu efeito protetor na formação de FCA, uma vez que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. Os ácidos graxos voláteis também diferiram significativamente entre os grupos alimentados com a bebida, sugerindo que somente a soja e o cupuaçu, influenciaram na formação desses compostos. O pH fecal reduziu apenas a partir da sétima semana do período experimental, enquanto que, a contagem de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais durante o período avaliado. O colesterol total, HDL e o LDL não diferiram ( $p > 0,05$ ) nos grupos alimentados com a bebida em relação aos grupos controle. Pode-se atribuir o efeito não significativo da bebida nos parâmetros avaliados nos animais tratados com a DMH, possivelmente, à duração do experimento.

**Palavras-chave:** cupuaçu, probiótico, matriz vegetal, FCA, dimetilhidrazina.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O câncer de cólon é uma patologia que se caracteriza por um crescimento desordenado de uma população de células que escapam da regulação normal de crescimento, replicação e diferenciação (WISEMAN, 2011). Morfologicamente, pode apresentar-se como alterações microscópicas discretas da mucosa, denominadas focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré neoplásicas, que podem ser induzidas, quimicamente, pela administração da droga 1,2-dimetрилhidrazina, em animais experimentais (BIRD, 1987; BIRD, 1995). Devido ao número total e ao tamanho dos FCA serem determinados de forma simples, rápida e econômica, sua avaliação constitui um bioensaio de curto prazo para avaliar o emprego de agentes dietéticos quimiopreventivos na carcinogênese colorretal (NEWELL; HEDDLE, 2004).

Entre os componentes responsáveis pela saúde do intestino destacam-se os prebióticos e os probióticos. Os prebióticos, são pertencentes ao grupo das fibras dietéticas, resistentes à ação de enzimas digestivas, mas fermentadas por bactérias intestinais, com a formação de substratos que propiciam proteção ao intestino (ANDERSON et al., 2009). Adicionalmente, existem dados mostrando a atuação das fibras na redução de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e neoplasia de cólon em indivíduos com um consumo adequado das mesmas (KACZMARCZYKA, MILLERA; FREUND, 2012; BERNAUD; RODRIGUES, 2013).

Os probióticos são caracterizados por gêneros como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., e entre os principais efeitos atribuídos ao consumo de probióticos estão: a manutenção do balanço da microbiota intestinal, o antagonismo do crescimento de patógenos, o estímulo do sistema imunológico e a redução da intolerância à lactose, que beneficiam a saúde aumentando a proteção contra infecções intestinais e a prevenção de diversas doenças como o câncer de cólon (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Os probióticos são utilizados principalmente na elaboração de leites fermentados (SANCHEZ et al., 2009) e outros produtos lácteos, como iogurte (KAILASAPATHY, 2006), sorvete (HOMAYOUNI et al., 2008), queijo (FRITZEN-FREIRE et al., 2010), e em menor quantidade para carnes, cereais, legumes e frutas (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008).

O cupuaçu, fruta tropical típica da floresta amazônica, apresenta alto teor de pectina, comparável ao do maracujá-amarelo (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009), uma fibra solúvel, que suprimiu significativamente FCA no cólon de ratos induzidos ao câncer e aumentou de 3 a 5 vezes o conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta (RAO et al., 1998). Além disso, a pectina tem demonstrado redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos e humanos (PIEIDADE; CANNIATTI-BRAZACA, 2003; FREITAS; JACKIX, 2005; EUFRÁSIO et al., 2009,).

O extrato hidrossolúvel de soja também é um substrato que tem se apresentado com potencial para produção de novos produtos com apelo saudável (GRANATO et al. 2010; ULIANA; VENTURINI FILHO; ULIANA, 2012). Os produtos da soja vêm sendo avaliados como veículos para probióticos, e estudos têm indicado uma série de benefícios para a saúde. Os efeitos sinérgicos entre os probióticos e proteína produtos da soja sugerem que essa combinação pode exercer efeitos benéficos, uma vez que a soja contém oligossacarídeos naturais como a rafinose e estaquiase, considerados como prebióticos e que estimulam o crescimento de probióticos, além de serem uma alternativa viável para pessoas que apresentam alergias e/ou distúrbios alimentares pela ingestão de leite (KARR-LILIENTHAL, et al., 2005; WOO et al., 2009).

Assim, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da ingestão de néctar a base de polpa de cupuaçu e extrato hidrossolúvel de soja adicionado de culturas probióticas no desenvolvimento de lesões pré neoplásicas em ratos *Wistar*, além de avaliar opH e a microbiota fecal dos animais e quantificar os ácidos graxos voláteis e *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. nas fezes dos animais.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

No capítulo 1 foram demonstrados o desenvolvimento e a otimização da formulação a base de cupuaçu e proteína de soja, de acordo com um planejamento experimental de delineamento composto central, a fim de definir as concentrações ótimas de polpa de cupuaçu e proteínas de soja. No capítulo 2, na formulação otimizada contendo 20 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteínas de soja, foram adicionadas culturas liofilizadas prontas para uso direto (DVS – Direct Vat Set) de *Lactobacillus acidophilus* LA-3 (Sacco® Brasil, Campinas - SP) e *Lactobacillus paracasei* BGP 1 (Sacco® Brasil, Campinas - SP). Assim, foram elaborados o néctar de cupuaçu contendo proteína de soja adicionado de: *L. acidophilus* LA-3, *L. paracasei* BGP 1 e com a mistura das duas culturas probióticas, na proporção de 1:1. A quantidade média de células viáveis da bactérias nas bebidas foram:  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, para *L. acidophilus* LA-3 isolado e sua mistura (*L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* BGP 1) e  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, para *L. paracasei* BGP 1 isolado. Estas bebidas foram administradas em ratos *Wistar* induzidos a lesões pré-neoplásicas.

### 4.2.1. Animais e Tratamentos

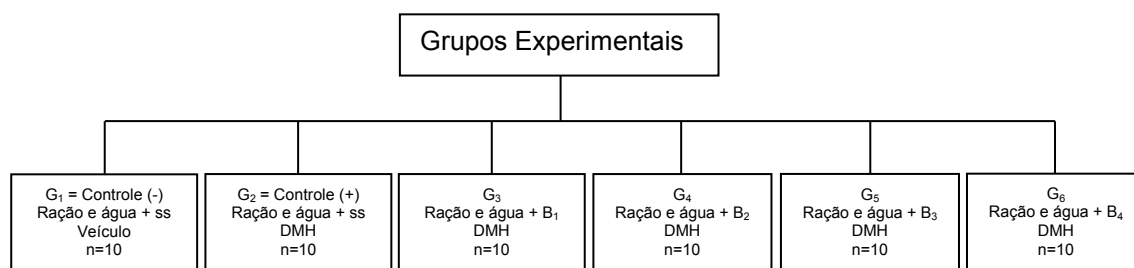
Para o cálculo amostral, foram utilizados 10 animais por grupo, considerando o nível de significância de 5 % e poder do teste de 90 %, admitindo-se que as variáveis estudadas são instáveis (ARMITAGE e BERRY, 1987). Sabe-se que a confiabilidade dos dados depende do grau de liberdade do resíduo, logo, recomenda-se na análise estatística experimental um grau de liberdade (GL) no mínimo maior que 12. Assim, em qualquer teste estatístico a análise de variância residual estará presente e esta variância é proveniente da equação: SQ Resíduo/ GL Resíduo, onde, quanto menor o GL, maior a Soma do Quadrado do Resíduo.

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos, com peso médio de  $352 \pm 1,11$  g e 12 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram divididos randomicamente em seis grupos, com dez animais cada. Os grupos denominados G<sub>1</sub> e o G<sub>2</sub> foram controle negativo e controle positivo, respectivamente, sendo alimentados apenas com dieta comercial (Presence<sup>®</sup>) indicada para a alimentação de roedores. Os demais grupos (G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub> e G<sub>6</sub>), além da ração e água, receberam as bebidas desenvolvidas, as quais foram administradas para os animais por meio da técnica de gavagem, na quantidade de 3 mL/kg de peso/dia, durante o período de 10 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 23 °C e receberam ração e água *ad libitum*. A dieta e o peso dos animais foram monitorados semanalmente, ao longo de todo o experimento.

#### 4.2.2 Indução Química de Lesões Pré Neoplásicas

Na segunda e terceira semana de experimento, os animais dos grupos G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub> e G<sub>6</sub> foram submetidos a um total de 4 injeções intraperitoneal de 40 mg/kg massa corporal/aplicação de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (Sigma, Saint Louis, MO, USA), sendo realizadas 2 aplicações semanais em dias não consecutivos, durante duas semanas. A droga (DMH) foi preparada imediatamente antes do uso, dissolvida em NaCl 0,9 % contendo 1 mM de EDTA e 10 mM de citrato de sódio como veículo, na concentração final de 10 mg/mL, sendo o pH final ajustado para 8,0 com NaOH 1 N (NEWELL; HEDDLE, 2004). Os animais do grupo G<sub>1</sub>, para serem submetidos ao mesmo nível de estresse, receberam nos mesmos dias somente o veículo, sem a DMH, como observado no desenho experimental apresentado na Figura 1.



**FIGURA 1:** Desenho experimental de ratos Wistar tratados com e sem indução de lesões pré-neoplásicas. G = Grupo; SS = Solução salina; DMH = Dimetilhidrazina; B<sub>1</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS); B<sub>2</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3; B<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei*; B<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei*.

Após o período experimental, na 7ª semana contada a partir da última aplicação da DMH, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e, em seguida, dessensibilizados com isoflurano, utilizando aparelho de anestesia inalatória. O procedimento de eutanásia foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental, em ambiente tranquilo e adequado. Todo o procedimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, após a aprovação pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 43/2013.

#### **4.2.3 Quantificação e Categorização dos Focos de Criptas Aberrantes (FCA)**

Após a eutanásia, o cólon foi removido, aberto longitudinalmente pela banda contra mesentérica, lavado em solução tampão fosfato 0,01 M e colocado em placas de parafina, com a mucosa voltada para cima, tendo as extremidades fixadas por alfinetes e fixado em formalina de Carson (CARSON; MARTIN; LYNN, 1973) por 24 horas. Após a fixação, o cólon foi medido e dividido em três segmentos iguais, identificados como segmentos proximal, medial e distal, em relação ao ceco. Para a contagem de FCA, os segmentos foram corados em solução de azul de metileno a 0,1 %, por dois minutos e lavados em tampão fosfato 0,01 M. A contagem das lesões foi realizada por microscopia óptica com aumento de 10X, de acordo com a técnica de Bird (BIRD, 1987), por dois observadores de maneira duplo-cega. Os FCA foram caracterizados por dilatações na abertura luminal, epitélio mais espesso e coloração mais intensa quando comparados às vizinhas. A categorização de FCA foi baseada na multiplicidade de criptas aberrantes por foco (FCA  $\leq$  3 e FCA > 3).

#### **4.2.4 Determinação de Ácidos Graxos Voláteis nas Fezes**

Após a eutanásia, as fezes do ceco de todos os animais foram recolhidas individualmente em *ependorffs* e armazenadas a - 80 °C, para análise posterior dos ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico). Para a determinação, o conteúdo cecal de cada animal foi extraído com ácido metafosfórico a 25 % e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(CLAE) de acordo com a metodologia de Smiricky-Tjardes et al. (2003), utilizando-se um cromatógrafo (THERMO mod. ACCELLA PDA) acoplado a detector ultravioleta e coluna C18 (SUPELCO) utilizando-se um comprimento de onda de 210 nm.

#### 4.2.5 Determinação do pH Fecal

Para cada grupo experimental, o pH fecal foi determinado a partir da dissolução de 1 g de fezes em 10 mL de água destilada, e medição em pHmetro (ASVARUJANON; ISHIZUKA; HARA 2005). As avaliações foram realizadas no 1º, 14º, 28º, 49º e 70º dia, a partir do início do experimento.

#### 4.2.6 Quantificação de Microrganismos Fecais

As amostras de fezes dos animais experimentais foram colhidas em tubos estéreis, no 1º, 14º, 28º, 49º e 70º dia, a partir do início do experimento.

De cada grupo, foi pesado 1 g de fezes e diluído em 9 mL de solução salina estéril. A partir dessa diluição ( $10^{-1}$ ) foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-8}$ , por meio da transferência de 1 mL da diluição anterior para tubos estéreis contendo 9 mL de solução salina. O inóculo (1 mL) de cada diluição  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  foi semeado em profundidade no respectivo meio de cultura.

- **Para a enumeração seletiva de *Lactobacillus* spp.:** Foi utilizado o ágar Rogosa SL (Himédia, Índia), com incubação em jarra de anaerobiose a 37 °C, durante 72 horas (MELLO et al., 2009).
- **Para a enumeração seletiva de *Bifidobacterium* spp.:** Foi utilizado o ágar *Bifidobacterium* (Himédia, Índia), com incubação a 37 °C durante 72 horas, em jarra de anaerobiose com sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbia (Anaerobac, Probac®), modificado por Zacarchenco; Massaguerroig (2004). Após 72 horas de incubação, foi realizada a contagem e determinado o  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> de fezes.

#### 4.2.7 Análises Bioquímicas

Imediatamente após a eutanásia dos animais, coletou-se as amostras de sangue e, para a obtenção do soro, estas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C. As determinações dos parâmetros bioquímicos triglicéridos, colesterol total e

suas frações LDL e HDL, foram realizadas utilizando-se kits comerciais (Bioclin<sup>®</sup>, Brasil).

#### **4.2.8 Índice Hepatosomático (IHS)**

O índice hepatossomático foi calculado por meio da relação entre o peso do fígado e o peso corporal do animal, de acordo com a equação 1:

$$IHS = \frac{\text{Peso do Fígado (g)}}{\text{Peso Corporal (g)}} \times 100 \quad \text{equação (1)}$$

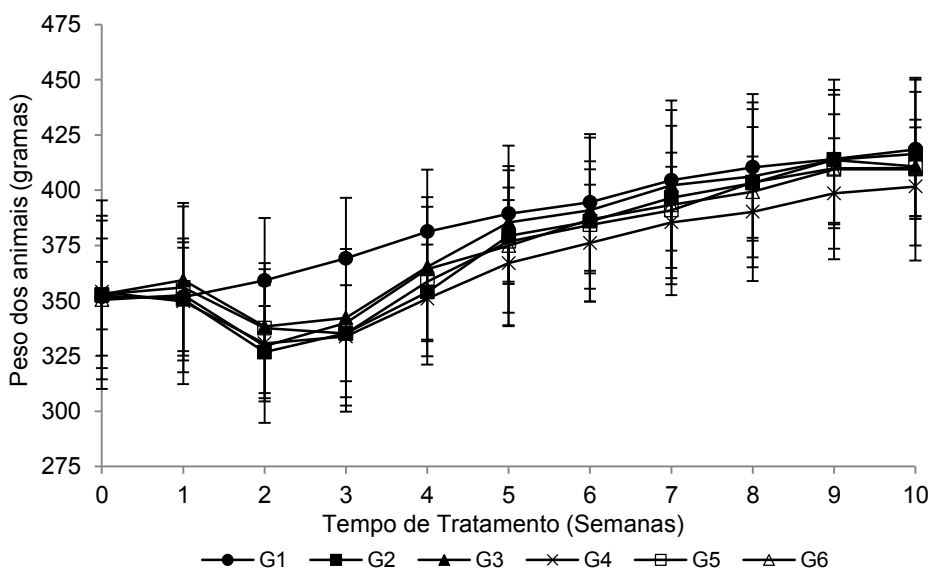
#### **4.2.9 Análise Estatística**

Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa *BioEstat 5.0*.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Evolução da massa corporal de ratos *Wistar* induzidos a lesões pré neoplásicas

Os resultados referentes a massa corporal média dos animais, durante 10 semanas do período experimental, estão apresentados na Figura 2. Verificou-se que todos os grupos aumentaram a massa corporal, porém não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os mesmos. Na segunda e terceira semana de tratamento verificou-se uma redução na velocidade de crescimento dos grupos induzidos, provavelmente, em função da administração do carcinógeno, uma vez que somente o grupo G<sub>1</sub> não apresentou esse comportamento. Em relação ao consumo alimentar (dados não mostrados), também não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 2:** Ganho de massa corporal dos grupos avaliados durante o período experimental. G<sub>1</sub> = Controle Negativo; G<sub>2</sub> = DMH; G<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS) + DMH; G<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH; G<sub>5</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei* + DMH; G<sub>6</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH. \*Os resultados (médias  $\pm$  desvio padrão) não diferem ( $p > 0,05$ ) para o teste de Tukey.

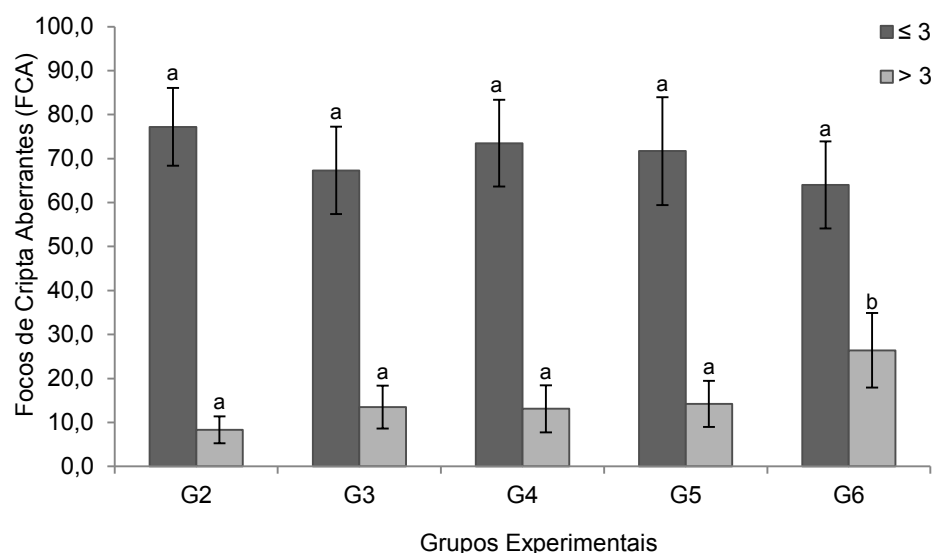
Mohania; Kansal; Shah (2013) e Venâncio et al. (2013), também verificaram que o ganho de massa e o consumo alimentar foram menores durante a administração da DMH ao testarem, respectivamente, um alimento probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum* em ratos induzidos a lesões pré neoplásicas, e os efeitos da polpa de marolo nas características bioquímicas destes animais. Guo et al. (2013), ao avaliarem as saponinas da soja na progressão do câncer de cólon em ratos induzidos por

DMH, também observaram que não houve diferença significativa no aumento de peso entre os grupos e, os animais induzidos com DMH tiveram um aumento de massa corporal menor em comparação com o grupo que recebeu injeções de solução salina. Os autores também não verificaram diferença significativa no consumo alimentar.

Os grupos que receberam diariamente o néctar de cupuaçu e PS com ou sem probióticos se comportaram de maneira similar aos grupos controle, com exceção do grupo G<sub>4</sub>, que apresentou a partir da quarta semana, um decréscimo, no ganho de massa corpórea. Os grupos G<sub>5</sub> e G<sub>6</sub>, também apresentaram redução de peso nas últimas semanas, o que pode ser atribuído as culturas usadas na formulação da bebida, uma vez que, os probióticos têm mostrado os efeitos positivos nas desordens metabólicas e regulação do peso. Exemplos disso, foram o uso da estirpe *Lactobacillus gasseri* SBT 2055, que mostrou efeito positivo na redução da gordura abdominal (KADOOKA et al., 2010) e a suplementação de *Lactobacillus plantarum* strain N14 acompanhada por uma redução no tamanho dos adipócitos em ratos (TAKEMURA; OKUBO; SONOYAMA, 2010).

#### **4.3.2 Número de FCA e quantificação de AGV em modelo animal da carcinogênese colorretal**

A multiplicidade das criptas (número de criptas por FCA), é um parâmetro importante que permite avaliar o avanço de FCA (CHENG; LAI, 2003). Ao avaliar a multiplicidade das criptas, observou-se que independentemente da região do cólon, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais para a categoria FCA  $\leq 3$ . Entretanto, para a categoria FCA  $> 3$ , houve diferença significativa para o grupo G<sub>6</sub>, que apresentou um aumento de aproximadamente 50 % de FCA em relação aos outros grupos(Figura 3).



**FIGURA 3:** Número médio de FCA no cólon de ratos wistar dos grupos experimentais após 10 semanas de tratamento, categorizados em  $\leq 3$  ou  $> 3$  FCA. G<sub>2</sub> = DMH; G<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS) + DMH; G<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH; G<sub>5</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei* + DMH; G<sub>6</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH. Os resultados seguidos de mesma letra minúscula nas colunas não diferem ( $p > 0,05$ ) para o teste de Tukey.

Pretlow et al. (1992) encontraram forte correlação entre a multiplicidade de criptas e a incidência de tumor. O número de FCA, com mais de quatro criptas, foi maior em ratos com tumores, se comparados com os que não desenvolveram tumores, o que pode tornar essa avaliação uma predição da incidência do câncer de cólon. Takayama et al. (2005), verificaram que a relação de FCA para adenoma e câncer em pacientes com displasia é de 4,2 e de 10,2, respectivamente. Já a relação para adenoma e câncer, em pacientes com número de FCA elevados ( $\geq 20$  criptas) é de 5,3 e 24,6, respectivamente. Logo, os pacientes que têm displasias e número de FCA elevadas, tem um alto risco de adenoma e posterior câncer.

Modelos que utilizam o carcinógeno DMH sugerem que o número de FCA aumenta com o decorrer do tempo. Isso sugere que alguns deles podem se desenvolver mais rapidamente que outros. Esses focos também podem sofrer remodelação, sendo que os menores (FCA  $\leq 3$ ) podem regredir e os maiores (FCA  $> 3$ ) apresentam probabilidade de progredirem para o câncer (BIRD, 1995; RAJU, 2008). Segundo Raju (2008), pode-se reconhecer dois tipos de criptas tanto em roedores quanto em humanos: convencionais e displásicas. Os convencionais, durante a carcinogênese do cólon induzida em ratos, aparece a partir da oitava semana após as injeções do carcinógeno,

enquanto que, FCA convencionais e displásicos são observados com cerca de 12 semanas após a indução. As criptas convencionais são mais comuns e evidências sugerem menor probabilidade de progressão para o câncer, enquanto que, FCA displásicos são menos comuns, porém mais agressivos, e são considerados uma provável lesão relacionada a progressão neoplásica.

Dessa forma, a ausência de diferença entre os grupos controle (DMH) e os grupos que receberam o néctar de cupuaçu para  $FCA \leq 3$ , pode-se justificar em função do curto tempo de tratamento (7 semanas após a indução). A diferença apresentada no  $G_6$ , foi devido a maior incidência de FCA com 4 e 5 criptas. Por tanto, levando-se em conta o conceito de que essas lesões podem regredir ou apenas deixarem de progredir (BIRD, 1995), não se pode afirmar que nesse grupo, o efeito do néctar foi negativo.

Urbanska et al. (2009) estudaram as propriedades de células bacterianas probióticas microencapsuladas em iogurte em ratos com pré disposição para o câncer colorretal. A administração oral diária do iogurte contendo *L. acidophilus* microencapsulado resultou em significativa supressão da incidência de tumor de cólon, multiplicidade e tamanho do tumor.

Liboredo et al. (2013) ao determinarem após 14 semanas de período experimental, o efeito de probióticos sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos induzidos com DMH, observaram que o consumo de lactobacilos e bifidobactérias resultou numa redução significativa do número total de FCA de 55,7 % e 45,1 %, respectivamente, sendo que, foi observada significativa redução apenas em  $FCA < 3$  no grupo tratado com lactobacilos (52,2 %) em comparação com o grupo controle. Os  $FCA \geq 3$  não apresentaram redução significativa.

Os resultados da quantificação e categorização, em relação a região do intestino, de FCA entre os diferentes grupos experimentais, são apresentados na Tabela 1. O grupo  $G_1$  não apresentou criptas aberrantes, uma vez que não foi tratado com a DMH e, apesar do grupo  $G_3$  alimentado com a bebida sem probióticos ter apresentado um número menor de FCA, não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,01$ ) na contagem de criptas entre os grupos avaliados.

**TABELA 1:** Número total de FCA e por região (distal, medial e proximal) do cólon de ratos *Wistar* dos grupos experimentais após 10 semanas de tratamento.

Grupos	n	Número de FCA por Região do Cólon						Total de FCA *
		Distal		Medial		Proximal		
		≤ 3	> 3	≤ 3	> 3	≤ 3	> 3	
G <sub>1</sub>	10	0	0	0	0	0	0	0
G <sub>2</sub>	10	28,8 ± 6,9 <sup>a</sup>	2,3 ± 1,6 <sup>a</sup>	34,7 ± 5,6 <sup>a</sup>	5,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	13,7 ± 3,5 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	85,6 ± 9,6 <sup>a</sup>
G <sub>3</sub>	10	27,8 ± 5,0 <sup>a</sup>	4,6 ± 2,0 <sup>a</sup>	31,0 ± 6,8 <sup>a</sup>	8,6 ± 2,8 <sup>a,b</sup>	8,5 ± 2,6 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	81,4 ± 12,1 <sup>a</sup>
G <sub>4</sub>	10	25,6 ± 5,2 <sup>a</sup>	2,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	36,0 ± 5,2 <sup>a</sup>	10,4 ± 4,4 <sup>a,b</sup>	11,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	86,6 ± 11,7 <sup>a</sup>
G <sub>5</sub>	10	27,0 ± 5,8 <sup>a</sup>	4,5 ± 1,4 <sup>a</sup>	37,1 ± 5,5 <sup>a</sup>	9,5 ± 4,3 <sup>a,b</sup>	7,6 ± 2,4 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	85,9 ± 13,9 <sup>a</sup>
G <sub>6</sub>	10	26,9 ± 6,5 <sup>a</sup>	9,9 ± 3,2 <sup>b</sup>	29,7 ± 7,3 <sup>a</sup>	13,5 ± 5,8 <sup>b</sup>	7,4 ± 2,1 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	87,8 ± 14,4 <sup>a</sup>

G<sub>1</sub> = Controle Negativo; G<sub>2</sub> = DMH; G<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS) + DMH; G<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH; G<sub>5</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei* + DMH; G<sub>6</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH. Os resultados (médias ± desvio padrão) seguidos de mesma letra minúscula nas colunas não diferem ( $p > 0,05$ ) e \*( $p > 0,01$ ) para o teste de Tukey.

Já foram verificadas evidências em modelos experimentais com animais da administração das proteínas da soja para a proteção contra o câncer e doenças cardíacas. Hakkak et al. (2001), observaram que ratos alimentados com uma dieta a base de caseína tiveram uma incidência de 50 % dos tumores do cólon, em comparação com 12% em dietas cuja base era de proteína de soja. Estes resultados sugerem que o consumo de proteínas de soja na dieta reduz o risco de desenvolver tumores de cólon.

A soja apresenta componentes com propriedade anticarcinogênica como isoflavonas, saponinas, ftalato, inibidores de protease e fitoesteróis (MESSINA; BARNES, 1991). Entre esses componentes, a literatura mostra que as saponinas apresentam atividade antioxidante, protegendo contra o dano celular no câncer de cólon (GUO et al., 2013). Outro anticarcinógeno presente na soja, é o fitoesterol, que é um composto vegetal não absorvido pelos humanos, logo, ao ser ingerido alcança o cólon intacto, onde parece exercer efeito protetor por meio da inibição da carcinogênese (YASUKAWA et al., 1991).

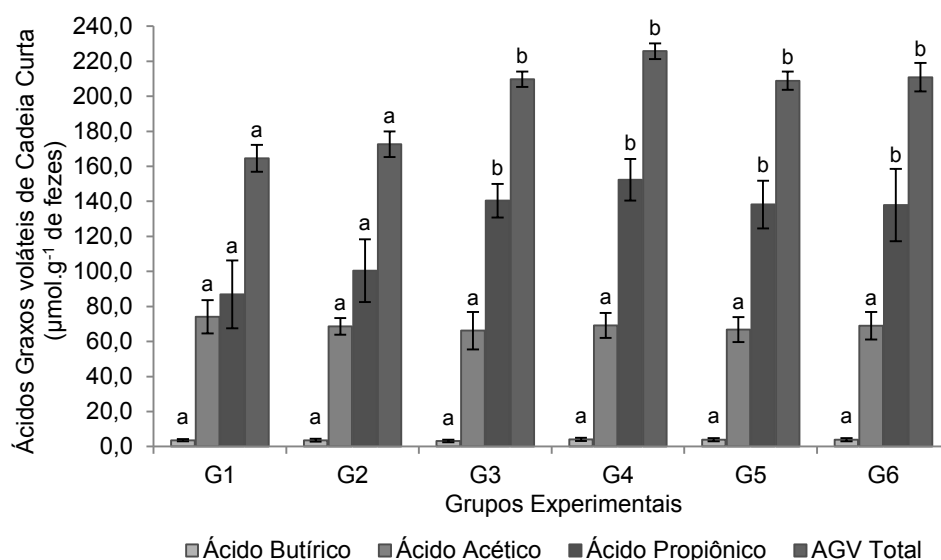
Os resultados da Tabela 1, mostram que o néctar de cupuaçu e PS ou sua suplementação com culturas probióticas não interferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) no número total de FCA em relação ao controle G<sub>2</sub> (DMH). No cólon distal e medial, não foram observadas diferenças entre os grupos para FCA ≤ 3, enquanto no cólon proximal, o grupo G<sub>4</sub> (néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH), apresentou-se estatisticamente

semelhante ao grupo controle G<sub>2</sub> (DMH), com a maior incidência de focos para esta categoria.

FCA > 3 foram observadas em todos os grupos. Na porção medial e distal para FCA > 3, apenas o grupo G<sub>6</sub> (néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle G<sub>2</sub>, com maior incidência de focos. Já, na porção proximal, não observou-se diferença significativa entre os grupos, além de apresentarem os menores valores de FCA > 3. A aparente explicação para essa diferença, é que a mucosa intestinal na região distal fica mais tempo exposta a possíveis carcinógenos e agressões físicas, provocadas pelo enrijecimento fecal (GUYTON; HALL, 2006), assim, uma frequência maior de FCA é observada na região distal e medial do cólon, tanto em roedores como no homem (RODRIGUES et al., 2002) com menor proporção na região proximal (BIRD; GOOD, 2000).

O seguimento proximal do cólon também é responsável pela maior produção de ácidos graxos voláteis (AGV). São produzidos de 100 a 200 mM de AGV no cólon humano diariamente e estima-se que destes, 70 a 140 mM sejam produzidos no cólon proximal, reduzindo para 20 a 70 mM no cólon distal (COOK; SELLIN, 1998).

Na Figura 4, estão apresentados os resultados da concentração de ácidos graxos voláteis. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos na concentração de ácido acético e ácido butírico. Entretanto, para o ácido propiônico, verifica-se que os grupos alimentados com o néctar, apresentaram diferença em relação aos grupos controle (G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) com quantidades muito superiores do ácido.



**FIGURA 4:** Concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeia curta nas fezes dos animais dos grupos experimentais. G<sub>1</sub> = Controle Negativo; G<sub>2</sub> = DMH; G<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS) + DMH; G<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH; G<sub>5</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei* + DMH; G<sub>6</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH. Os resultados (médias ± desvio padrão) seguidos de mesma letra minúscula nas colunas não diferem ( $p > 0,05$ ) para o teste de Tukey.

Uma explicação para a baixa quantidade de ácido butírico encontrada, pode estar relacionada ao fato do mesmo, ser a maior fonte de energia para as células epiteliais do cólon (ALMEIDA et al., 2009), sendo usado preferencialmente ao acetato e propionato numa proporção de 90: 50: 30, respectivamente (COOK; SELLIN, 1998), confirmando os resultados encontrados nos grupos tratados com a bebida.

Sabe-se que a produção de AGV é dependente dos substratos. O amido, por exemplo, é altamente butirogênico, enquanto que a fermentação de outros polissacarídeos resulta na produção de acetato e propionato (PRYDE et al., 2002). Assim, esse resultado é justificado por se tratar de uma bebida a base de polpa de cupuaçu e PS sem amido na formulação.

Por outro lado, a polpa de cupuaçu apresenta alto teor de pectina (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009), que é uma fibra solúvel importante na manutenção e renovação do epitélio intestinal, pois pode formar por meio de fermentação, ácidos graxos voláteis, que estão envolvidos na regulação da divisão e morte celular (PIEIDADE; CANNIATTI-BRAZACA, 2003). Fukunaga et al. (2003), ao avaliarem os efeitos da pectina na proliferação celular intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta e população microbiana, verificou

que a suplementação com pectina não afetou a microbiota cecal, entretanto, o conteúdo de AGV cecal foi significativamente aumentado.

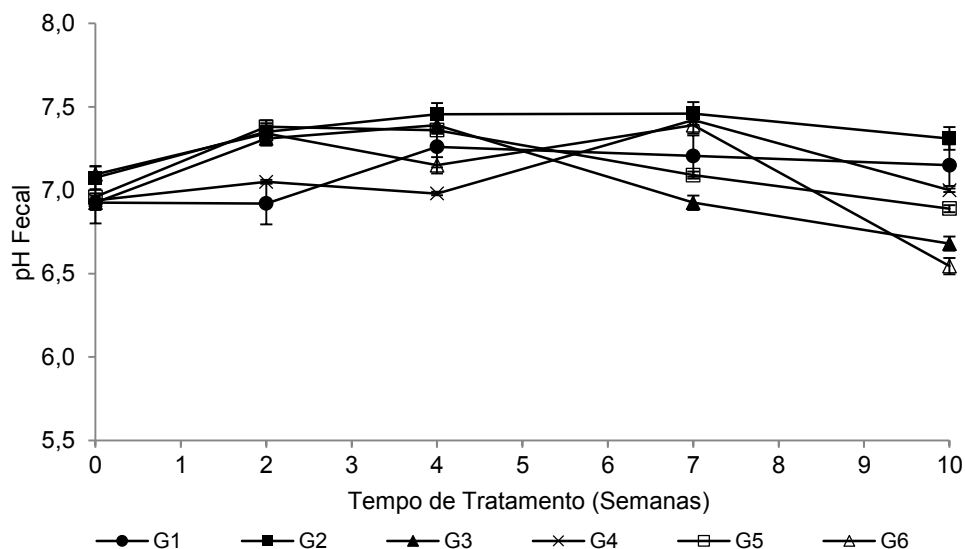
Ishikawa et al. (2005) examinaram a hipótese da administração de fibras e probióticos como *L. casei* prevenirem o câncer de cólon em população com risco de desenvolvimento de lesões intestinais, após remoção de pelo menos dois adenomas. Não constatou-se diferença significativa no desenvolvimento de novas lesões no cólon entre 2 e 4 anos. Entretanto, após 4 anos, a ocorrência de lesões de moderada e elevada intensidade, foi significativamente reduzida no grupo que recebeu *L. casei* diminuindo, assim, as chances de progredir para um câncer de cólon. Entretanto, neste trabalho, durante o período avaliado, não se pode afirmar que os probióticos contribuíram para o aumento do *pool* de AGV, uma vez que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos que receberam as bebidas com e sem probióticos.

O resultado encontrado no teor de AGV, para os grupos alimentados com o néctar, também pode ser justificado devido a soja apresentar oligossacarídeos não digeríveis que são conduzidos ao intestino e fermentados por bactérias anaeróbias, resultando na produção de AGV. Vários autores encontraram diferenças na produção de AGV entre animais alimentados com dietas contendo esses açúcares. Sakaguchi; Sacoda; Toramaru (1998) verificaram maior produção dos ácidos propiônico e butírico no ceco de ratos alimentados com uma dieta enriquecida com oligossacarídeos de rafinose e Smiricky-tjardes et al. (2003) encontraram resultados semelhantes em porcos alimentados com dieta a base de farinha de soja.

#### **4.3.3 Análise do pH e microbiota fecal de ratos *Wistar* induzidos a lesões pré neoplásicas**

Alguns pesquisadores têm sugerido que um elevado pH intestinal pode estar relacionado com o aumento do risco de câncer de cólon, ao contrário da acidificação que poderia contribuir para prevenir a formação de carcinógenos (DONGOWSKI et al., 2002; DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010; BROWNAWELL et al., 2012).

Na Figura 5, pode-se observar que o pH inicial não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os grupos e a partir da sétima semana de experimento, houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ), nos grupos alimentados com a bebida. Esta redução do pH intestinal, segundo Macfarlane; Steed; Macfarlane (2008) e Scott; Duncan; Flint (2008), pode estar relacionada diretamente a fermentação de fibras dietéticas, ou seja, a produção de AGV. E, como observado na Figura 4, houve maior produção de AGV totais, nesses grupos.

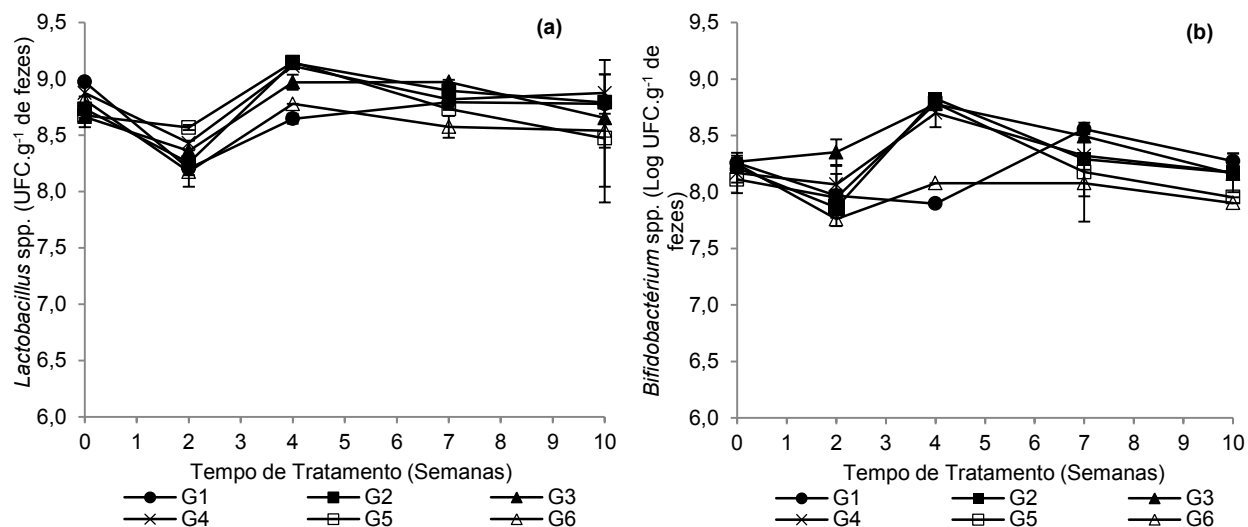


**FIGURA 5:** Evolução do pH nas fezes do animais dos grupos experimentais. G<sub>1</sub> = Controle Negativo; G<sub>2</sub> = DMH; G<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS) + DMH; G<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH; G<sub>5</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei* + DMH; G<sub>6</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH.

Bouhnik et al. (2004) consideraram que o pH fecal pode não ser um bom indicador da acidificação intestinal, uma vez que não observaram alteração no pH fecal de 200 voluntários saudáveis que ingeriram carboidratos não digeríveis, mesmo com o aumento no número de bifidobactérias fecais. Burigo et al. (2007) também não observaram alteração no pH fecal, mesmo com o aumento de bifidobactérias após a suplementação com fruto-oligossacarídeos em pacientes com neoplasias hematológicas submetidos a quimioterapia.

Neste trabalho observou-se um comportamento diferente, pois apesar do pH fecal ter diminuído nas últimas semanas de experimento, não houve alteração significativa ( $p > 0,05$ ), entre a contagem inicial e final de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., como pode ser observado na Figura

6. Assim, não pode-se sugerir que essas bactérias, exerceram efeitos protetores no intestino dos animais.



**FIGURA 6:** Crescimento de *Lactobacillus* spp. (a) e *Bifidobacterium* spp. (b) em fezes dos animais, durante o período experimental. G<sub>1</sub> = Controle Negativo; G<sub>2</sub> = DMH; G<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS) + DMH; G<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH; G<sub>5</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei* + DMH; G<sub>6</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH.

Os gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. são responsáveis por efeitos fisiológicos que melhoram a saúde. Apesar do néctar de cupuaçu e PS não apresentar efeitos na microbiota dos animais, acredita-se que esses probióticos, podem inibir o desenvolvimento de lesões pré neoplásicas pelo aumento da resposta imune do hospedeiro, degradação de agentes cancerígenos, alteração da microbiota intestinal que produz agentes com potencial carcinogênico, produção de metabólitos antitumorais e alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal (LIONG, 2008). Outro mecanismo pelo qual eles podem beneficiar a saúde humana é por reduzirem o pH no intestino grosso por meio da síntese de ácidos graxos de cadeia curta, inibindo assim o crescimento de bactérias patogênicas (BIOVATI, MATTARELLI, 2006).

#### 4.3.4 Efeito do néctar de cupuaçu e PS sobre os lipídeos sanguíneos e o Índice Hepatosomático de ratos *Wistar*

Os resultados na Tabela 2, demonstraram que nos grupos tratados com o néctar de cupuaçu e PS, com ou sem probiótico, houve uma redução dos triglicerídeos. Contudo, o efeito da bebida na redução do colesterol total, LDL e HDL, não foi significativo ( $p > 0,05$ ).

Teixeira et al. (2000) observaram um ligeiro aumento no HDL após a alimentação com soja ou isoflavonas, enquanto Bhatena (2003), verificou uma pequena ou nenhuma mudança na redução no HDL colesterol. Neste trabalho, para os valores encontrados nos grupos avaliados nenhuma modificação significativa foi observada nesses índices.

**TABELA 2:** Concentrações séricas de Triglicerídeos, Colesterol Total, LDL e HDL e Índice Hepatosomático de ratos *Wistar* submetidos aos diferentes tratamentos com néctar probiótico de cupuaçu e PS.

Grupos	n	Triglicerídeos (mmol.L <sup>-1</sup> )	Colesterol Total (mmol.L <sup>-1</sup> )	LDL (mmol.L <sup>-1</sup> )	HDL (mmol.L <sup>-1</sup> )	Índice Hepatosomático (%)
G <sub>1</sub>	8	0,72 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,14 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,10 <sup>a,b</sup>
G <sub>2</sub>	8	0,70 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,22 ± 0,25 <sup>a</sup>
G <sub>3</sub>	8	0,59 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,15 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,10 <sup>a,b</sup>
G <sub>4</sub>	8	0,56 ± 0,10 <sup>b</sup>	2,13 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,81 ± 0,20 <sup>b</sup>
G <sub>5</sub>	8	0,63 ± 0,11 <sup>c</sup>	2,13 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,23 <sup>a,b</sup>
G <sub>6</sub>	8	0,63 ± 0,13 <sup>c</sup>	2,12 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,94 ± 0,31 <sup>a,b</sup>

G<sub>1</sub> = Negativo; G<sub>2</sub> = DMH; G<sub>3</sub> = Néctar de cupuaçu e Proteína de Soja (PS) + DMH; G<sub>4</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 + DMH; G<sub>5</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. paracasei* + DMH; G<sub>6</sub> = Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3 e *L. paracasei* + DMH. Os resultados (médias ± desvio padrão) seguidos de mesma letra minúscula nas colunas não diferem (p > 0,05) para o teste de Tukey.

Embora neste trabalho não tenha sido observada modificações no colesterol nos grupos tratados com probióticos, Park et al. (2007) examinaram o efeito de uma ração suplementada com *L. acidophilus* ATCC 43121 liofilizado nos lipídeos séricos de ratos com hipercolesterolemia induzida. Após 21 dias de estudo verificou-se uma redução de 25 e 42 %, nos níveis de colesterol total e colesterol não HDL (VLDL+IDL+LDL), respectivamente.

A ação hipocolesterolemia dos probióticos também pode ser potencializada pela utilização de um prebiótico (ZHANG, 2007). As bactérias probióticas fermentam os carboidratos não-digeríveis provenientes dos alimentos no intestino. Os ácidos graxos voláteis resultantes dessa fermentação possivelmente causam diminuição das concentrações sistêmicas dos lipídeos sanguíneos, através da inibição da síntese de colesterol hepático e/ou da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado (PEREIRA, GIBSON, 2002).

Em relação índice hepatossomático (IHS), observou-se, que nos grupos que sofreram indução com a DMH, somente o G<sub>4</sub> apresentou-se

estatisticamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao grupo controle  $G_2$ . Logo, não pode-se afirmar que a diferença observada esta relacionada a aplicação da DMH. Além disso, segundo Gartner e Hiat (2003), quando drogas hepatotóxicas são administradas, ou uma parte do fígado é removida, os hepatócitos proliferam e recuperam sua arquitetura e tamanho originais, fazendo com que o órgão apresente grande capacidade regenerativa após injúria. Em roedores por exemplo, após a retirada de 75 % do órgão, ele se regenera em 4 semanas.

O IHS também foi avaliado, a fim de comparar com o resultado encontrado por Machado et al. (2003), que utilizaram uma cultura de *L. acidophilus*, para avaliar seu efeito na modulação dos níveis de colesterol sérico em ratos machos *Wistar*, e atribuíram o aumento do fígado, ao consumo de leites fermentados, os quais podem provocar o desvio de colesterol sérico para o fígado. Esse comportamento não foi observado neste trabalho, uma vez que, o grupo  $G_4$  (Néctar de cupuaçu e PS contendo *L. acidophilus* LA-3), apresentou menor IHS. Além disso, para indução do fígado gorduroso, ocorre a redução do colesterol plasmático, o que não foi observado, pois não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos que consumiram o néctar com as culturas probióticas ( $G_4$ ,  $G_5$  e  $G_6$ ) e o néctar sem probióticos ( $G_3$ ).

#### 4.4. CONCLUSÃO

O consumo da dieta e o peso dos animais não sofreram alterações significativas entre os grupos avaliados.

A ingestão do néctar adicionado de probiótico não exerceu efeito protetor na formação de FCA, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos com e sem probiótico.

Os ácidos graxos voláteis também não apresentaram diferença significativa entre os grupos para os ácidos butírico e acético. Entretanto, em relação ao ácido propiônico, houve aumento significativo nos grupos tratados com o néctar quando comparados aos grupos controle, sugerindo que somente a soja e o cupuaçu, influenciaram na formação desse ácido.

O pH fecal apresentou uma diminuição apenas a partir da sétima semana do período experimental, enquanto que, a contagem de *Lactobacillus* ssp. e *Bifidobactérias* ssp. não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais.

Nas determinações séricas somente os triglicerídeos nos grupos alimentados com a bebida apresentaram decréscimo significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparados aos grupos controle, enquanto que, nos valores de colesterol total, LDL e HDL não foram observadas alterações.

A administração da DMH e/ou o consumo do néctar com e sem probióticos não alteraram o índice hepatossomático dos animais, uma vez que, somente o grupo alimentado com o néctar adicionado de *L. acidophilus* LA-3 apresentou-se menor em relação aos outros grupos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIBET, V. B. P. Disbiose Intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 24, n. 1, p. 58 - 65, 2009.

ANDERSON, J. W.; BAIRD, P.; DAVIS, R. H. JR.; FERRERI, S.; KNUDTSON, M.; KORAYM, A.; WATERS, V.; WILLIAMS, C. L. Health benefits of dietary fiber. **Nutricion Reviews**, v. 67, p. 188 - 205, 2009.

ASVARUJANON, P; ISHIZUKA, S.; HARA, H. Promotive effects of nondigestible disaccharides on rat mineral absorption depend on the type of saccharide. **Nutrition**, v.21, n.10, p. 1025 - 1035, 2005.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, p. 57 - 56, 2013.

BHATHENA, S. J.; ALI, A. A.; HAUDENSCHILD, C.; LATHAM, P.; RANICH, T.; MOHAMED, A. I.; HANSEN, C. T.; VELASQUEZ, M. T. Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, p. 157 - 64, 2003.

BIOVATI, B.; MATTARELLI, P. The Family Bifidobacteriaceae. **Prokaryotes**, v. 3, p. 322 - 382, 2006.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, v. 37, p. 147 - 151, 1987.

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, n. 112 - 113, p. 395 - 402, 2000.

BIRD, R. P. Role of aberrante crypt foci in understanding the pathogenesis of colon câncer. **Cancer Latters**, v. 51, p. 55 - 71, 1995.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; VICAUT, E.; NEUT, C.; FLOURIE, B.; BROUNS, F.; BORNET, F. R. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobactéria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1658 - 1664, 2004.

BROWNAWELL, A, M.; CAERS, W.; GIBSON, G. R.; KENDALL, C. W. C.; LEWIS, K. D.; RINGEL, Y.; SLAVIN, J. L. Prebiotics and the health benefits of fiber: Current regulatory status, future research, and goals. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 5, p. 962 - 974, 2012.

BURIGO, T.; FAGUNDES, R. L. M.; TRINDADE, E. B. S. M.; VASCONCELOS, H. C. F. F.. Efeito bifidogênico do fruto-oligossacarídeo na microbiota intestinal

de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 130 - 135, 2007.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 59, p. 365 - 373, 1973.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, p. 539 - 543, 2008.

CHENG, L.; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n.12, p. 2642 - 9. 2003.

COOK, S. L.; SELLIN, J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 12, p. 4999 - 5007, 1998.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, n. 1, 2010.

DONGOWSKI, G.; HUTH, M.; GEBHARDT, E.; FLAMME, W. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3704 - 3714, 2002.

EUFRÁSIO, M. R.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R, V.; ABREU, W. C.; LIMA, M. A. C.; PEREIRA, M. C. A. Efeito de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 6, p. 1608 - 1614, 2009.

FREITAS, D. D. C.; JACKIX, M. N. H. Effect of a beverage with added fructooligosaccharide and pectin on the cholesterol level and stimulation of bifidobacteria in hypercholesterolemic hamsters. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n.1, p. 81 - 86, 2005.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 621 - 627, 2010.

FUKUNAGA, T.; SASAKI, M.; ARAKI, Y.; OKAMOTO, T.; YASUOKA, T.; TSUJIKAWA, T.; FUJIYAMA, Y.; BAMBA, T. Effects of the soluble fibre pectin on intestinal cell proliferation, fecal short chain fatty acid production and microbial population. **Digestion**, v. 67, p. 42 - 49, 2003.

GARTNER, L. P.; HIAT, L. P. **Tratado de Fisiologia**, 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 456, 2003.

GRANATO, D.; RIBEIRO, J. C. B.; CASTRO, I. A.; MASSON, M. L. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 121, p. 899 – 906, 2010.

GUO, Y.; CHEN, Y.; CHIU, W.; LIAO, H.; LIN, S. Soy saponins mediate the progression of colon cancer in rats by inhibiting the activity of  $\beta$ -glucuronidase and the number of aberrant crypt foci but not cyclooxygenase-2 activity. **ISRN Oncology**, v. 2013, 2013.

GUYTON A, C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**, Rio de Janeiro: 11. ed. Elsevier, 2006.

HAKKAK, R.; KOROURIANA, S.; RONIS, M. J. J.; JOHNSTON, J. F.; BADGERA, T. M. Soy protein isolate consumption protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. **Cancer Letters**, v. 166. p. 27 - 3, 2001.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. **Journal of Applied Science**, v .8, n. 2, p. 379 - 382, 2008.

ISHIKAWA, H.; AKEDO, I.; OTANI, T.; SUZUKI, T.; NAKAMURA, T.; TAKEYAMA, I.; ISHIGURO, S.; MIYAOKA, E.; SOBUE, T.; KAKIZOE, T. Randomized trial of dietary fibre and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. **International Journal of Cancer**, v. 116, p. 762 - 7, 2005.

KACZMARCZYKA, M. M.; MILLERA, M. J.; FREUND, G. G. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon câncer. **Metabolism**, v. 61, p. 1058 - 1066, 2012.

KADOOKA, Y.; SATO, M.; IMAIZUMI, K.; OGAWA, A.; IKUYAMA, K. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p. 636 - 643, 2010.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p.1221 - 1227, 2006.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR. G. C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock production Science**, v. 97, p. 1 - 12, 2005.

LIBOREDO, J. C.; ANASTÁCIO, L. R.; PELÚZIO, M. C. G.; VALENTE, F. X.; PENIDO, L. C. P.; NICOLI, J. R.; CORREIA, M. I. T. D. Effect of probiotics on the development of dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the mice colon. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 5, 2013.

LIONG, M. T. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and *in vivo* evidence. **International Journal of molecular sciences**, v. 9, p. 854 - 863, 2008.

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

MACFARLANE, G.T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 305 - 344, 2008.

MACHADO, D.; FERREIRA, C. L. L. F.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, T. L. Efeito de probiótico na modulação nos níveis de colesterol sérico e peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 270 - 275, 2003.

MELLO, R. M. P.; MORAIS, M. B.; TAHAN, S.; MELLI, L. C. F. L.; RODRIGUES, M. S. C.; MELLO, C. S.; SCALETSKY, I. C. A. Lactobacilli and bifidobacteria in the feces of schoolchildren of two different socioeconomic groups: children from a favela and children from a private school. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 4, 2009.

MESSINA, M.; BARNES, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 17, p. 541 - 6, 1991.

MOHANIA, D.; KANSAL, V. K.; SHAH, D. Probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* suppresses DMH induced preneoplastic lesions in early colorectal carcinogenesis in Wistar rats. **American Journal of Cancer Biology**, v. 1, p. 1 - 14, 2013.

NEWELL, L. E.; HEDDLE, J. A. The potent colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mutation Research**, v. 14, n. 564, p. 1 - 7, 2004.

PARK, Y.H.; KIM, J. G.; SHIN, Y. W.; KIM, S. H.; WHANG, K. Y. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 55 - 662, 2007.

PEREIRA, D. I. A.; GIBSON, G. R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 259 - 281, 2002.

PIEADADE, J.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e de pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sanguíneo em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 149 - 156, 2003.

PRETLOW, T. P.; O'RIORDAN, M. A.; PRETLOW, T. G.; STELLATO, T. A. Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement**, p. 55 - 62, 1992.

PRYDE, S. E.; DUNCAN, S. H.; HOLD, G.L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 17, p. 133 - 139, 2002.

RAJU, J. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: Relevance in studying chemoprevention of colon cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 6632 - 35, 2008.

RAO, C. V.; CHOU, D.; SIMI, B.; KU, H.; REDDY, B. S. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1815 - 1819, 1998.

RODRIGUES, M. A. M; SILVA, L. A. G; SALVADORI, D. M. F; CAMARGO, J. L. V; MONTENEGRO, M. R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 3, p. 351 - 355, 2002.

SAKAGUCHI, E.; SAKODA, C.; TORAMARU, Y. Caecal fermentation and energy accumulation in the rat fed on indigestible oligosaccharides. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 469 - 476, 1998.

SANCHEZ, B.; REYES-GAVILAN, C. D.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 472 - 483, 2009.

SCOTT, K. P.; DUNCAN, S.H.; FLINT, H. J. Dietary fibre and the gut microbiota. **Nutrition Bulletin**, v. 33, p. 201 - 11, 2008.

SMIRICK-TJARDES, M. R.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; FAHEY, G. C. JR. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentive characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2535 - 45, 2003.

TAKAYAMA, T.; MIYANISHI, K.; HAYASHI, T.; KUKITSU, T.; TAKANASHI, K.; ISHIWATARI, H.; KOGAWA, T.; ABE, T.; NIITSU, Y. Aberrant crypt foci: Detection, gene abnormalities, and clinical usefulness. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, p. 42 - 45, 2005.

TAKEMURA, N.; OKUBO, T.; SONOYAMA, K. *Lactobacillus plantarum* strain n<sup>o</sup> 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, p. 849 - 856, 2010.

TEIXEIRA, S. R.; POTTER, S. M.; WEIGEL, R.; HANNUM, S.; ERDMAN, J. W. JR.; HASLER, C. M. Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1077 - 84, 2000.

ULIANA, M. R.; VENTURINI FILHO, W. G.; ULIANA, L. R. Nota Científica: Teste de aceitação de bebida mista de soja e amora. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 174 – 181, 2012.

URBANSKA, A. M.; BHATHENA, J.; MARTONI, C.; PRAKASH, S. I. Estimation of the potential antitumor activity of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in Apc (Min/+) mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, p. 264 - 273, 2009.

VENÂNCIO, V. P.; FERREIRA, E.B.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; PAULA, F. B. A.; BARBISAN, L.F.; AZEVEDO, L. *Annona crassiflora* Mart. fruit pulp effects on biochemical parameters and rat colon carcinogenesis. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 4, 2013.

VRIESMANN, L.C.; PETKOWICZ, C. L. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 72 - 79, 2009.

WISEMAN, M. Nutrição e câncer. In: MANN, J.; TRUSWELL, A. S. **Nutrição Humana**, v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

WOO, Y. P.; FUNG, W. Y.; EASA, A. M.; LIONG, M. T. Probiotic-fermented soy foods: benefits and enhanced bioactivities. **Acta Alimentaria**, v. 38, n. 3, p. 381-391, 2009.

YASUKAWA, K.; TAKIDO, M.; MATSUMOTO, T.; TAKEUCHI, M.; NAKAGAWA, S. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. **Oncology**, v.48, p.72-76, 1991.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUERROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 674 - 679, 2004.

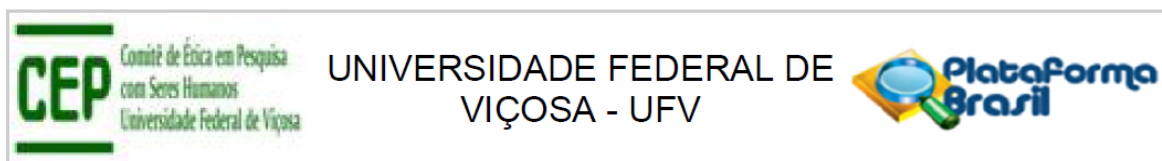
ZHANG, F.; HANG, X.; FAN, X.; LI, G.; YANG, H. Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal. **Anaerobe**, v. 13, p.185 - 192, 2007.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Mediante os resultados pode-se concluir que:

- ✓ O néctar a base de cupuaçu e proteína de soja apresentou parâmetros físico-químicos próprios para esse tipo de bebida e obteve aceitabilidade sensorial, com escores médios acima de 5,0 para os atributos sabor e impressão global, considerados satisfatórios por se tratar de uma bebida contendo soja.
- ✓ A metodologia de superfície de resposta permitiu indicar o ensaio com 20 % de polpa de cupuaçu e 2,5 g de proteína de soja, como a formulação mais aceita, na qual foram adicionadas as culturas probióticas.
- ✓ Os néctares adicionados das culturas probióticas apresentaram aumento da acidez e diminuição do pH durante as quatro semanas de armazenamento, característico da atividade metabólica das culturas, entretanto, não afetou a viabilidade das culturas utilizadas, fazendo do néctar uma matriz promissora para veicular as culturas probióticas.
- ✓ Os néctares com as diferentes culturas probióticas não apresentaram diferenças de coloração entre eles ao longo do período de armazenamento.
- ✓ O néctar com *L. acidophilus* LA-3 apresentou a menor sobrevivência ao final da simulação gastrointestinal *in vitro*, enquanto que o néctar contendo *L. paracasei* BGP1 e a mistura *L. acidophilus* LA-3/ *L. paracasei* BGP1 foram mais tolerantes ao estresse simulado.
- ✓ Na avaliação sensorial, o néctar controle (sem probiótico) e o contendo *L. acidophilus* LA-3, tiveram a melhor aceitação, possivelmente em decorrência da menor acidez apresentada.
- ✓ No ensaio *in vivo*, os resultados sugerem que a ingestão do néctar a base de cupuaçu e proteína de soja adicionado de probiótico não exerceu efeito protetor na formação de focos de criptas aberrantes.
- ✓ A quantidade de ácidos graxos voláteis nas fezes dos animais que foram tratados com os néctares mostraram que a bebida contribuiu para o aumento na produção destes compostos benéficos ao intestino.
- ✓ Os néctares adicionados de culturas probióticas promoveram redução significativas nas concentrações séricas de triglicédeos dos animais tratados com as bebidas. Por outro lado, não modificaram o metabolismo do colesterol.

## ANEXO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE UM NECTAR PROBIÓTICO A BASE DE CUPUAÇU E SOJA E AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS IN VIVO EM RATOS WISTAR INDUZIDOS A LESÕES PRÉ NEOPLÁSICAS

**Pesquisador:** Afonso Mota Ramos

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 24877813.0.0000.5153

**Instituição Proponente:** Departamento de Tecnologia de Alimentos

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 553.865

**Data da Relatoria:** 11/04/2014

#### Apresentação do Projeto:

Diante da procura dos consumidores por alimentos mais saudáveis, capazes de trazer benefícios extras à saúde, e dos potenciais efeitos benéficos da soja e dos probióticos, este trabalho propõe-se a elaborar uma bebida de cupuaçu contendo extrato hidrossolúvel de soja e probióticos, além de avaliar sua funcionalidade, visando obter um alimento de rápido e fácil consumo, capaz de agregar elementos biocêuticos e nutricionais de grande relevância à dieta humana e colaborando também para a exaltação das frutas brasileiras, ainda não utilizadas pela população. Inicialmente será realizada a caracterização das matérias primas e em seguida, a otimização da formulação da bebida, através de um planejamento experimental. Na segunda etapa da pesquisa, na formulação mais aceita pela análise sensorial, serão adicionadas culturas liofilizadas prontas para uso direto de bactérias lácticas de *L. acidophilus* LA-5 e *L. paracasei*. Para isso, serão preparados o néctar de cupuaçu e extrato hidrossolúvel de soja com: *L. acidophilus* LA-5 (T1), *L. paracasei* (T2) e com a mistura das duas culturas lácticas, na proporção de 1:1 (T3), com 3 repetições para cada tratamento. Essas bebidas serão administradas por gavagem em ratos wistar induzidos a lesões pré neoplásicas por um período de 10 semanas, quando serão eutanasiados com todos os procedimentos conduzidos conforme parecer do Comitê de Ética/UFV processo nº43/2013.

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior  
**Bairro:** campi Viçosa **CEP:** 36.570-000  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 553.865

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

- Desenvolver um néctar probiótico a base de cupuaçu e extrato hidrossolúvel de soja e avaliar seus efeitos in vivo em ratos wistar após indução de lesões pré neoplásicas.

Objetivos Secundários:

- Otimizar a formulação da bebida a base de cupuaçu e extrato hidrossolúvel de soja;
- Avaliar a viabilidade probiótica dos *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* na bebida com cupuaçu e o extrato hidrossolúvel de soja, durante o armazenamento refrigerado da bebida pronta;
- Avaliar os efeitos da funcionalidade da bebida na dieta dos ratos em relação a evolução de lesões pré-neoplásicas;
- Avaliar os efeitos morfológicos do consumo da bebida no intestino de animais com e sem indução de lesões pré-neoplásicas.
- Avaliar o pH e a microbiota fecal dos animais durante o tratamento com as bebidas probióticas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores o risco inclui possível desconforto gastrointestinal por se tratar da degustação de alimento, no entanto será conduzida de forma a minimizar ao máximo tal risco por meio da pasteurização da bebida, tratamento que elimina todos os micro-organismos patógenos da bebida. Os benefícios citados refere-se ao fato das informações levantadas estarem ampliando o conhecimento dos pesquisadores em relação a elaboração de uma bebida de fruta com potencial probiótico

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa os responsáveis tomarão o cuidado de excluir pessoas diabéticas ou com intolerância a glicose por conta do açúcar presente na formulação do néctar, pessoas que não gostem de soja ou de cupuaçu, e menores de 18 anos de idade e que discordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos de apresentação obrigatória estão de acordo com as normas do CEP.

**Recomendações:**

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior  
**Bairro:** campi Viçosa **CEP:** 36.570-000  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 553.865

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram corrigidas e os documentos necessário foram anexados.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ao término da pesquisa é necessária a apresentação do Relatório Final e após a aprovação desse, deve ser encaminhado o Comunicado de Término dos Estudos.

Projeto analisado durante a 10ª reunião de 2013.

VICOSA, 12 de Março de 2014

---

**Assinador por:**  
**Patrícia Aurélia Del Nero**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior  
**Bairro:** campi Viçosa **CEP:** 36.570-000  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br