

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE BEBIDA MISTA DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL
DE SOJA E SUCO DE UVA SUBMETIDA A DIFERENTES DOSES DE
RADIAÇÃO GAMA**

ÉRICA AMANDA DE BARROS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE BEBIDA MISTA DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL
DE SOJA E SUCO DE UVA SUBMETIDA A DIFERENTES DOSES
RADIAÇÃO GAMA**

ÉRICA AMANDA DE BARROS

Orientador: Prof. Dr. Fernando Broetto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU – SP

Janeiro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B277p Barros, Érica Amanda de, 1987-
Produção de bebida mista de extrato hidrossolúvel de soja e suco de uva submetida a diferentes doses de radiação gama / Érica Amanda de Barros. - Botucatu : [s.n.], 2016
xv, 119 f. : fots. color.; grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Fernando Broetto
Inclui bibliografia

1. Bebidas não-alcoólicas - Avaliação sensorial. 2. Soja - Processamento. 3. Uva - Processamento. 4. Microbiologia. I. Broetto, Fernando. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PRODUÇÃO DE BEBIDAS MISTA DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA E SUCO DE UVA SUBMETIDO A DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO GAMA"

AUTORA: ÉRICA AMANDA DE BARROS

ORIENTADOR: FERNANDO BROETTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FERNANDO BROETTO

Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu



Profa. Dra. REGINA MARTA EVANGELISTA

Dep de Horticultura / Faculdade de Ciências Agronomicas de Botucatu



Prof. Dr. ROGÉRIO LOPES VIEITES

Dep de Horticultura / Faculdade de Ciências Agronomicas de Botucatu



Profa. Dra. LUCIANA MANOEL DE OLIVEIRA

Instituto Federal de São Paulo - Avaré



Prof. Dr. MARCELO ALVARES DE OLIVEIRA

EMBRAPA - Soja/Londrina

Botucatu, 21 de janeiro de 2016.

DEDICO

Ao meu marido Vladimir que me apoiou, me incentivou e colaborou em muitos momentos no decorrer dos experimentos. Por sempre me tranquilizar, compreender e ter paciência comigo mesmo nas etapas complicadas dessa jornada.

A minha família, especialmente minha avó Rosa e aos meus pais, Ademir e Márcia, que sempre estiveram presentes me apoiando, incentivando, consolando e além de tudo, me motivando a conquistar meus sonhos!

*Somos todos anjos de uma asa só,
precisamos nos abraçar para alçar
vôo.*

Fênix Faustine

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof Dr. Fernando Broetto, agradeço pela amizade, conselhos, por me apoiar no desenvolvimento desse experimento, e por tudo que me ensinou. A maior aprendizagem foi descobrir que para se realizar ciência de qualidade, faz-se necessário muita reflexão, paciência, organização e além de tudo, unidade do grupo científico. Posso dizer que com maestria, o senhor construiu um laboratório que desenvolve pesquisa com harmonia, onde o grupo é unido, solícito, solidário, paciente e disciplinado.

Aos professores Dr. Vladimir Eliodoro Costa (Departamento de Biofísica-IBB) pelos ensinamentos sobre radiação gama, Dr^a. Miriam Hamuri Tsunemi pela contribuição no delineamento experimental (Departamento de Bioestatística-IBB), Dr^a. Vera Lúcia Mores Hall por me permitir realizar as análises microbiológicas em seu laboratório (Departamento de Microbiologia-IBB), Dr. Marco Antônio Tecchio por intermediar a doação das uvas fornecidas pelo centro de frutas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), as quais foram utilizadas na confecção do suco de uva desse estudo. E ao Dr. Rogério Lopes Vieites por disponibilizar seu laboratório para a realização de algumas análises físico-químicas (Departamento de Horticultura- FCA).

A EMBRAPA-Soja, em especial ao Marcelo Alvares de Oliveira pela doação de soja. A NEXIRA pela doação da goma acácia. E ao IPEN por irradiarem minhas amostras.

A Ivana por me ajudar com as análises microbiológicas, obrigada pelas dicas, conversas e risadas.

As minhas amigas: Paula Martinhão, Verônica Ramos e Daniela Massardi, a prima Noéli Gonçalves que sempre se importaram em saber como caminhavam meus experimentos, escutando meus desabafos. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos, risadas, atenção e conversas descontraídas. Adoro vocês.

Paula, hoje posso dizer que uma mente sã, depende de um corpo em equilíbrio, e isso apenas foi possível graças a sua companhia me incentivando e me motivando aos exercícios e corridas. Sua disciplina é uma inspiração, muito obrigada por tudo!!!

Agradeço a todos do laboratório, meus irmãos científicos, Edilson, Dayanne, Renata, Ricardo, Jéssicas, Chiara, Enrique e Luz. Todos contribuíram para a

realização desse trabalho. Além da colaboração, obrigada pela linda amizade que construímos, pelas risadas e pelos momentos agradáveis de distração.

Ao Vladimir, meu marido e amigo, por compreender as ausências e pela paciência comigo nos dias estressantes. Obrigada por toda ajuda durante os experimentos, pelo respeito, companheirismo e carinho. Amo você por tudo que é e faz por mim.

Sou muito grata a minha sogra, que nos momentos turbulentos esteve presente me ajudando em casa e no laboratório. Osmarina, obrigada pelas conversas agradáveis, conselhos e amizade. Agradeço as minhas cunhadas (Tânia e Marilu) e cunhados (Giu e Tales), que sempre se importaram e se preocuparam comigo. Obrigada pelas conversas e risadas.

Ao meu pai e a minha segunda mãe, Nilza, que me acompanharam diversas vezes ao laboratório sempre que precisei. Obrigada pelas palavras reconfortantes, pelas dicas e companheirismo. A minha mãe e minha avó, Rosa, pelas oportunidades oferecidas, atenção, compreensão, aprendizagem, confiança, apoio e amor. Sou muito grata por vocês existirem em minha vida.

Aos familiares que torceram por mim.

Desculpe se deixei de citar alguns nomes, pois foram muitas pessoas que me acompanharam nessa caminhada. Mas quero deixar claro que sou sinceramente grata a todos que contribuíram na realização desse sonho.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABELAS | IX |
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XV |
| 1- RESUMO | 01 |
| 2- SUMMARY | 03 |
| 3- INTRODUÇÃO | 05 |
| 4- REVISÃO DE LITERATURA | 08 |
| 4.1- Soja: origem e histórico | 08 |
| 4.2- Botânica | 08 |
| 4.3- Mercado | 09 |
| 4.4- Composição química | 09 |
| 4.5- Fatores nutricionais e antinutricionais | 10 |
| 4.6- Extrato hidrossolúvel de soja (EHS) | 12 |
| 4.7- Frutos | 13 |
| 4.8- Suco de uva | 14 |
| 4.9- Aditivos | 16 |
| 4.10- Conservação e irradiação | 18 |
| 5- MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 5.1- Material | 21 |
| 5.2- Métodos | 23 |
| 5.2.1- Produção das bebidas | 25 |
| 5.2.2- Planejamento experimental | 29 |
| 5.2.2.1- Experimento 1 (Irradiação do grão de soja) | 30 |
| 5.2.2.2- Experimento 2 (Métodos de processamentos) | 30 |
| 5.2.2.3- Experimento 3 (Irradiação do EHS e do suco de uva) | 31 |
| 5.2.2.4- Experimento 4 (Bebida mista) | 31 |
| 5.2.3- Análise físico-química | 33 |
| 5.2.4- Análises bioquímicas | 36 |
| 5.2.5- Análises microbiológicas | 38 |
| 5.2.6- Análise sensorial | 40 |
| 5.2.7- Vida de prateleira | 42 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.8- Análise estatística..... | 43 |
| 6- RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 6.1- Experimento 1..... | 44 |
| 6.2- Experimento 2..... | 49 |
| 6.3- Experimento 3..... | 60 |
| 6.3.1- Etapa 1 (Dose de radiação em EHS)..... | 60 |
| 6.3.2- Etapa 2 (Dose de radiação em suco de uva) | 69 |
| 6.4- Experimento 4..... | 77 |
| 7- CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 97 |
| 8-CONCLUSÃO..... | 100 |
| 9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 101 |
| ANEXO 1..... | 117 |
| ANEXO 2..... | 118 |
| ANEXO 3..... | 119 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Limites da composição físico-química de suco integral de uva, estabelecidos pela legislação*..... | 15 |
| Tabela 2. Aditivos para alimentos e bebidas aprovados pela ANVISA, segundo as boas praticas de fabricação, utilizados para suplementar as amostras produzidas nos experimentos..... | 23 |
| Tabela 3. Resultado da contagem microbiológica do EHS produzido pelo método de extração a quente e a frio | 58 |
| Tabela 4. Mediana das notas dos atributos do EHS produzido pelo método de extração a quente e a frio | 59 |
| Tabela 5. Valores médios seguidos dos desvios padrões das determinações físico-químicas de EHS irradiado a 0, 2, 4 e 8 kGy. | 61 |
| Tabela 6. Resultados médios da contagem microbiológica de EHS submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy). | 67 |
| Tabela 7. Mediana das notas dos atributos dos EHS submetidos a 4 doses de radiação (0, 2, 4 e 8 kGy).. | 68 |
| Tabela 8. Valores médios seguidos do desvio padrão da composição físico-química de suco de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy) | 70 |
| Tabela 9. Resultados médios da contagem microbiológica de suco de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy)..... | 75 |
| Tabela 10. Mediana das notas dos atributos dos sucos de uva submetidos a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy).. | 76 |
| Tabela 11. Valores médios seguidos do desvio padrão da análise físico-química da bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (cinco dias após a produção do EHS), mantida a temperatura ambiente (A) e sob refrigeração a 4 °C (R) e com adição de conservante (AC e RC) | 78 |
| Tabela 12. Valores médios da composição físico-química de bebida mista de EHS com suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração a 4 °C, com (RC) e sem (R) conservante no prazo de nove meses. | 80 |
| Tabela 13. Resultados médios seguidos de desvio padrão dos componentes bioquímicos (compostos fenólicos- mg mL ⁻¹ ; flavonóides- mg mL ⁻¹ ; e capacidade antioxidante- μmol mL amostra ⁻¹) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida em temperatura ambiente (24°C) e sob refrigeração (4°C), sem adição de conservante (A e R) e com adição de conservante ácido benzóico (AC e RC) | 87 |

| | |
|--|----|
| Tabela 14. Valores médios seguidos de desvio padrão dos componentes bioquímicos (compostos fenólicos- mg mL^{-1} ; flavonóides- mg mL^{-1} ; e capacidade antioxidante- $\mu\text{mol mL amostra}^{-1}$) de bebida mista a base de EHS com suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração (4°C), sem (R) e com (RC) conservante ácido benzóico no prazo de nove meses..... | 88 |
| Tabela 15. Contagem microbiológica em bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração (4°C) ou temperatura ambiente (24°C), e sem ou com adição de conservante ácido benzóico por um período de nove meses. | 90 |
| Tabela 16. Mediana das notas dos atributos (escala e intensidade) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantidas em temperatura ambiente (A) e sob refrigeração (R), e com adição de conservante (AC e RC)..... | 92 |
| Tabela 17. Comparação dos atributos entre a bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração (4°C) sem (R) e com (RC) conservante ácido benzóico para cada mês (inicial, 2, 3 e 7). Valores expressos em medianas das notas. | 95 |
| Tabela 18. Mediana das notas do teste de intensidade de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida na temperatura ambiente (A- 24°C) e sob refrigeração (R- 4°C) e com conservante ácido benzóico (AC e RC), para cada atributo..... | 96 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Suco concentrado de maçã clarificado..... | 22 |
| Figura 2. Alfa-tocoferol (antioxidante) utilizado para suplementar o EHS..... | 22 |
| Figura 3: Esquema sobre o delineamento dos experimentos (1, 2, 3 e 4). | 24 |
| Figura 4. Fluxograma do método de processamento tradicional (moagem a frio)..... | 26 |
| Figura 5. Fluxograma do método de processamento <i>Illinois</i> , com modificações (moagem a quente) | 27 |
| Figura 6. Representação da cor sólida no espaço L a*b*. Fonte: Adaptado de Minolta (1994)..... | 36 |
| Figura 7. Diagrama de cromaticidade. Variação da saturação do índice c (0 a 60). Fonte: Konica Minolta (1998) | 36 |
| Figura 8. Resultados médios dos compostos fenólicos (mg de fenois g ⁻¹ b.s.), flavonóides (mg de fenois g ⁻¹ b.s.) e atividade antioxidante (µm 100g ⁻¹ b.s.) de cada cultivar de soja (BRS-213, BRS-258, EMBRAPA-48) submetido a diferentes doses de radiação gama (2, 4 e 8 kGy), sendo 0 a ausência de radiação (controle). Letras minúsculas comparam as diferenças entre as doses (horizontal) de cada determinação, letras maiúsculas, na vertical, comparam as diferenças entre as cultivares para cada dose recebida a partir do teste de Kruskal-Wallis..... | 45 |
| Figura 9. Atividade das enzimas SOD (Uso µ proteína ⁻¹), PPO (µmol de catecol mg de amostra ⁻¹), e POD (µmol de H ₂ O ₂ mg ⁻¹ de proteína) dos cultivares de soja BRS-213, BRS-258 e EMBRAPA-48 submetidos a doses de 2, 4 e 8 kGy, sendo 0 controle. Letras minúsculas na horizontal comparam as diferenças entre as doses de radiação para cada cultivar de soja. Letras maiúsculas na vertical comparam as diferenças entre os cultivares para cada dose recebida a partir do teste de Kruskal-Wallis..... | 48 |
| Figura 10. Resultados médios (n=3) da composição físico-química de EHS produzido pelo método de extração a frio (■) e a quente (■). Umid.:Umidade (%); ST: Sólidos Totais (%); SS.:Sólidos Solúveis (°Brix); Carb.: carboidratos (%). Cinzas (%), Lipídios (%), proteína (%) e pH (g de ácido cítrico 100 mL ⁻¹). Letras minúsculas diferentes entre os tratamentos indicam diferença a partir do teste T | 50 |
| Figura 11. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a*, intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b*, saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática (°Hue) de EHS produzido com o cultivar BRS-213 pelo método de extração a frio (■) e a quente (■). Ausência de letras diferentes indicam que não houve diferencia significativa a partir do teste T..... | 51 |
| Figura 12. Comparação dos valores médios do EHS puro (método de extração a frio) com o EHS suplementado com aditivos (tocoferol; ácido ascórbico; açúcar do | |

suco concentrado de maçã; estabilizantes- goma acácia e liga neutra; e todos os aditivos juntos) para cada componente bioquímico (compostos fenólicos- mg mL^{-1} ; flavonóides- mg mL^{-1} ; e capacidade antioxidante- $\mu\text{mol mL}^{-1}$ amostra). Letras maiúsculas distintas demonstram diferença das amostras suplementadas com a amostra controle (Puro) pela análise de comparação múltipla de Dunett53

Figura 13. Comparação dos valores médios do EHS puro (método de extração a quente) com o EHS suplementado (tocoferol; ácido ascórbico; açúcar do suco concentrado de maçã; estabilizantes- goma acácia e liga neutra; e todos os aditivos juntos) para cada componente bioquímico (compostos fenólicos- mg mL^{-1} ; flavonóides- mg mL^{-1} ; e capacidade antioxidante- $\mu\text{mol mL}^{-1}$ amostra). Letras maiúsculas distintas demonstram diferença das amostras suplementadas com a amostra controle (Puro) pela análise de comparação múltipla de Dunett55

Figura 14. Comparação entre os valores médios do EHS extraídos pelo método a frio (■) e a quente (■) e com cada aditivo utilizado para suplementá-lo (tocoferol; ácido ascórbico; açúcar do suco concentrado de maçã; estabilizantes- goma acácia e liga neutra; e todos os aditivos juntos) para os componentes bioquímicos: compostos fenólicos- mg mL^{-1} ; flavonóides- mg mL^{-1} ; e capacidade antioxidante- $\mu\text{mol mL}^{-1}$ amostra. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa a partir do teste T.....56

Figura 15. Valores de luminosidade (L), cor vermelha (+) ou verde (-) representado pelo índice a^* , cor de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b^* , de EHS puro (sem aditivos) e EHS (com aditivos) submetidos a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.63

Figura 16. Valores de saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática ($^{\circ}\text{Hue}$) de EHS puro (sem aditivos) e EHS (com aditivos) submetidos a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni..64

Figura 17. Valores médios de EHS submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy) para os componentes bioquímicos (compostos fenólicos- mg mL^{-1} ; flavonóides- mg mL^{-1} ; e capacidade antioxidante- $\mu\text{mol mL}^{-1}$ amostra). Ausência das letras indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni65

Figura 18. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a^* , intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b^* , saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática ($^{\circ}\text{Hue}$) de suco integral de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni72

Figura 19. Valores médios de suco integral de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy) para os componentes bioquímicos (compostos

fenólicos- mg mL⁻¹; flavonóides- mg mL⁻¹; e capacidade antioxidante- mmol TEAC L⁻¹). As letras representam as diferenças significativas entre os sucos com diferentes doses de radiação ($p \leq 0,05$) a partir do teste de comparação múltipla de Bonferroni.....73

Figura 20. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a*, intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b*, saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática (°Hue) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (coleta de 5 dias após a produção), mantida na temperatura ambiente e com adição de conservante (AC) e sem adição de conservante (A); mantida sob refrigeração com adição de conservante (RC) e sem adição (R). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni81

Figura 21. Bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy em copinhos de acrílico, contendo no primeiro da esquerda: (1A) amostra mantida na temperatura ambiente (24°C) e sem conservante; no segundo: (2AC) amostra mantida na temperatura ambiente (24°C) e com conservante ácido benzóico; no terceiro: (3R) amostra refrigerada (4°C) e sem conservante; e no quarto: (4RC) amostra refrigerada (4°C) e com conservante ácido benzóico.....82

Figura 22. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a*, intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b*, saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática (°Hue) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro e sétimo mês, mantidas sob refrigeração (4°C) e sem conservante. As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni83

Figura 23. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a*, intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b*, de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro, quinto, sétimo e nono mês, mantidas sob refrigeração (4 °C) e com conservante ácido benzóico (RC). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni84

Figura 24. Valores de saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática (°Hue) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro, quinto, sétimo e nono mês, mantidas sob refrigeração (4 °C) e com conservante ácido benzóico (RC). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.....85

Figura 25. Comparação dos valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a* e intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b* de bebidas mistas de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy refrigeradas (4 °C), sem (R) e com (RC) conservante ácido benzóico do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro e sétimo mês. As letras

representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.86

Figura 26. Mediana das notas dos atributos de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantidas sob refrigeração (4°C) e sem conservante durante 7 meses. Ausência de letras representa que não houve diferença significativa entre os meses de vida de prateleira para os atributos avaliados a partir do teste de Friedmann.....93

Figura 27. Mediana das notas dos atributos de bebida mista a base de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantidas sob refrigeração (4 °C) e com conservante ácido benzóico durante 9 meses. Ausência de letras representa que não houve diferença significativa entre os meses de vida de prateleira para os atributos avaliados a partir do teste de Friedmann94

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|---|
| EHS | Extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja) |
| A | amostra mantida em temperatura ambiente |
| AC | amostra mantida em temperatura ambiente e com adição de conservante |
| R | amostra mantida sob refrigeração |
| RC | amostra mantida sob refrigeração e com adição de conservante |
| °C | graus celsius |
| g | gramas |
| mg | miligramas |
| mL | mililitro |
| µL | microlitro |
| kGy | Quilo Gray |
| cal | caloria |
| kcal | quilo caloria |
| Min | minutos |
| Código análise sensorial -2 | muito menos intenso do jeito que gosto |
| Código análise sensorial -1 | um pouco menos intenso do jeito que gosto |
| Código análise sensorial 0 | intenso do jeito que gosto |
| Código análise sensorial 2 | muito mais intenso do jeito que gosto |
| Código análise sensorial 1 | um pouco menos intenso do jeito que gosto |

1-RESUMO

A irradiação é uma técnica de conservação ainda pouco aceita para alimentos e bebidas no Brasil, devido a grande parte da população desconhecer seus mecanismos de ação. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os aspectos físico-químico, bioquímico, microbiológico e sensorial de bebida mista de extrato hidrossolúvel de soja (EHS) e suco de uva, submetida à radiação gama. Neste estudo, foram realizados quatro experimentos, visando selecionar o melhor cultivar de soja (BRS-213, BRS-258 e EMBRAPA-48) em relação às características bioativas após a aplicação de diferentes doses de radiação gama (experimento 1). No segundo experimento, selecionou-se o método mais apropriado de produção do EHS a partir de duas formas de extração; determinou-se também a dose de radiação adequada para se aplicar ao EHS (etapa 1) e ao suco de uva (etapa 2), no experimento 3. No experimento 4 foi determinada a temperatura ideal de armazenamento e a adição ou não do conservante ácido benzoico em bebida mista de EHS e suco de uva. Para o experimento 1, realizou-se análises bioquímicas, sendo que nos demais, foram realizadas análises físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas e sensoriais. No experimento 4, realizou-se também o teste de vida de prateleira. A partir dos resultados submetidos à estatística descritiva e inferencial (testes paramétricos - t e ANOVA; e testes não paramétricos -Kruskall-Wallis e Friedmann) constatou-se que a elevação da dose de radiação gama aumentou o teor dos compostos fenólicos para os cultivares de soja BRS-213 e BRS-258, bem como a atividade da enzima superóxido dismutase no cultivar BRS-213 (experimento 1). O EHS extraído a frio apresentou maior teor de proteína, lipídios e compostos fenólicos que o EHS extraído a quente. Por outro

lado, a segunda extração apresentou melhores resultados na análise sensorial (experimento 2). No experimento 3 o EHS (etapa 1) submetido a 8 kGy apresentou menor teor de proteína e de compostos fenólicos. O EHS e o suco de uva (etapa 2) submetidos a 8 kGy demonstraram variação na cor e redução das notas do atributo sabor quando comparados aos demais tratamentos. A partir da dose de 2 kGy eliminou-se os bolores e leveduras do suco de uva. A bebida mista refrigerada e com adição de ácido benzoico apresentou maior vida de prateleira (9 meses). Concluiu-se que a dose de 4 kGy associada a refrigeração e ao conservante foi indicada para bebida mista de EHS com suco de uva, preservando suas características fitossanitárias, físico-químicas, bioquímicas e sensoriais.

Palavra-chave: análise sensorial, bioquímica, processamento de alimentos, microbiologia, soja, vida de prateleira e qualidade.

PRODUCTION OF MIXED BEVERAGE OF SOYBEAN HIDROSOLUBLE EXTRACT AND GRAPE JUICE SUBMITTED TO DIFFERENT GAMMA RADIATION DOSES. Botucatu, 2016. 119p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ÉRICA AMANDA DE BARROS

Adviser: FERNANDO BROETTO

2-SUMMARY

The gamma irradiation is a conservation technique still not accepted for food and beverages in Brazil, due to much of the population ignore their mechanisms of action. Thus, the aim of this study was to evaluate the physic-chemical, biochemical, microbiological and sensory aspect of mixed beverage of soybean hydrosoluble extract and grape juice, submitted to gamma radiation. In this study, four experiments were conducted in order to select the best soybean cultivar regarding the bioactive characteristics (BRS-213, BRS 258 and EMBRAPA-48) after application of different doses of gamma radiation (experiment 1). In the second experiment, we selected the most appropriate method of producing soybean hydrosoluble extract (EHS) from two forms of extraction. Also determined the adequate dosage of radiation to be applied to the EHS (step 1) and grape juice (step 2), in experiment 3. And the experiment 4 was determined the ideal storage temperature and with or without addition of the preservative benzoic acid in the mixed beverage of EHS and grape juice. For the experiment 1 was performed biochemical analyzes, and in the other were conducted in physical-chemical, biochemical, microbiological and sensory analyses. In experiment 4, it was also carried shelf life test. When results submitted to descriptive and inferential statistics (tests parametric- t and ANOVA, and nonparametric tests -Kruskall-Wallis and Friedman) it was found that the elevation of gamma radiation dose increased the content of phenolic compounds for the soybean cultivars BRS-213 and BRS-258 and SOD activity in cultivar BRS-213 (experiment 1). The EHS cold extraction has a higher protein, lipid and phenolic compounds content than the EHS hot extraction. On the other hand, the second extraction showed better results in sensory analysis (experiment 2). In experiment 3 EHS

(step 1) submitted to 8 kGy showed lower protein and phenolic compounds content. The EHS and grape juice (step 2) submitted to 8 kGy showed variation in color and reduction of notes of flavor attribute when compared to other treatments. From the dose of 2 kGy eliminates molds and yeast of grape juice. The refrigerated mixed beverage and with the addition of benzoic acid had longer shelf life (9 months). It was concluded that the dose of 4 kGy associated with refrigeration and preservative was nominated for mixed beverage of EHS with grape juice, preserving their phytosanitary characteristics, physical-chemical, biochemical and sensory..

Keyword: sensory analysis, biochemistry, food processing, microbiology, soybeans, shelf life and quality.

3-INTRODUÇÃO

A bebida mista de extrato de soja e suco de fruta é considerada funcional, pois a soja e os frutos apresentam compostos bioativos e nutrientes essenciais para manutenção da saúde humana (BRASIL, 1999). Porém, os sabores descritos como amargo, adstringente e rançoso, resultantes pela presença de diversos compostos orgânicos e principalmente pela ação das isoenzimas lipoxigenases (enzima oxidativa presente nos vegetais) limitam o consumo da soja e seus derivados (SILVA; CARRÃO-PANIZZI; PRUDÊNCIO, 2009).

As lipoxigenases causam reações de oxidação de lipídeos, que estão entre as mais frequentes em alimentos, sendo uma das principais causas de alteração organoléptica, e redução do valor nutricional, decorrentes da modificação de outras moléculas (ARAÚJO, 2004). Entretanto, ao utilizar elevadas temperaturas no processamento da soja, a lipoxigenase é desnaturada e os componentes antinutricionais inativados (DE BARROS *et al.*, 2014). Além disso, faz-se como alternativa viável o uso de cultivares de soja com ausência de lipoxigenase, os quais passaram por melhoramento genético através de cruzamento natural de espécies da leguminosa (EMBRAPA, 2015).

Bebidas a base de soja são frequentemente descritas pelo 'sabor de feijão cru' (*beany flavor*) e por apresentarem sensação palatável de farinácea. Tais condições indicam a necessidade de adequar a sua formulação, a fim de melhorar o sabor e as características de textura da bebida, contribuindo com o aumento ainda mais do consumo da soja e seus derivados (POTTER *et al.*, 2007).

A indústria procura por oportunidades de mercado e tende a diversificar seus produtos, preparando novos alimentos, reforçando os atributos sensoriais,

nutricionais e funcionais (SAKHALE; PAWAR; RANVEER, 2012). A respeito disso, o setor de bebidas não alcoólicas tem desenvolvido rapidamente novas apresentações de bebidas à base de frutas e legumes. As bebidas mistas estão atualmente alcançando popularidade em todo o mundo (ANDRÉS; TENORIO; VILLANUEVA, 2015).

Bebidas mistas de extrato de soja e suco de fruta constituem um dos setores da indústria alimentar com maior crescimento mundial e seu consumo tem experimentado enorme aumento nos últimos anos (SLOAN, 2005). Essa aceitabilidade está associada às características sensoriais desejáveis das frutas que mascaram o sabor e aroma característicos da soja, além dos consumidores apresentarem maior interesse por alimentos que agregam benefícios a saúde (ROSSI, 2003; TORREZAN *et al.*, 2004).

As bebidas a base de soja e suco de fruta apresentam quantidades significativas de nutrientes, fito-químicos e vitaminas (CILLA *et al.*, 2012). Dessa forma, o seu consumo representa uma contribuição saudável para a nutrição humana. Portanto, a qualidade organoléptica juntamente com os componentes bioativos e os benefícios de hidratação dessa bebida caracterizam-na como uma interessante opção de escolha especialmente para a dieta infantil e de idosos (ANDRÉS; TENORIO; VILLANUEVA, 2015).

Açúcares, ácidos orgânicos e minerais são largamente distribuídos em frutas e vegetais e constituem os principais sólidos solúveis em suco de fruta. Estes compostos interferem na doçura, textura ou estabilidade microbiológica das bebidas (HUANG; RASCO; CAVINATO, 2009). Alguns destes componentes também podem ser incorporados como aditivos. A quantidade e a composição de açúcares e ácidos orgânicos desempenham um papel decisivo nas propriedades sensoriais e na aceitabilidade de bebidas (KELEBEK; SELLI, 2011)

Tratamentos térmicos são os métodos mais utilizados para estender o prazo de validade das bebidas, eliminando os microrganismos e inativando enzimas, no entanto, o calor provoca perdas irreversíveis dos componentes nutricionais, alterações indesejáveis nas propriedades físico-químicas, e nos compostos antioxidantes (PLAZA *et al.*, 2006). Dessa maneira, pode-se destacar a vantagem de empregar as tecnologias não térmicas, as quais são essenciais para a obtenção de produtos alimentares com pouca perda nutricional (MORALES-DE LA PEÑA *et al.*, 2010a). A radiação ionizante quando administrada na dose adequada para determinado alimento ou bebida, interfere minimamente nas características sensoriais e nutricionais (LIMA FILHO *et al.*, 2012).

Com a evolução dos processos tecnológicos de conservação de alimentos, observou-se há mais de meio século, que a radiação gama com ^{60}Co ou com ^{137}Cs ou mesmo os feixes de elétrons acelerados são capazes de inibir a proliferação de microrganismos muitas vezes patogênicos que podem causar sérias doenças a população (KAFERSTEIN, 1993; ZHONG *et al.*, 2005). Além de inibir microrganismos, a radiação gama pode interagir com algumas moléculas presentes nos alimentos. Dentre os vários relatos abordando radiação, De Barros *et al.*(2014) detectaram redução de até 70% da enzima lipoxigenase em grão de soja submetido a 10 kGy, e Naresh *et al.* (2014) obtiveram aumento da capacidade antioxidante ao elevar a dose de radiação gama em suco de manga.

Os fatores descritos anteriormente indicam que além de sugerir uma bebida funcional, palatável e energética (frutas e extrato de soja) para dieta da população, é possível utilizar um método alternativo de conservação (irradiação gama), propondo induzir o aumento da validade do produto. Entretanto, faz-se necessário conhecer qual o dose de radiação gama mais adequada para a bebida mista sem que haja alterações das características nutricionais e organolépticas da bebida. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi produzir e avaliar as características nutricionais, bioquímicas, microbiológicas e sensoriais de bebida mista de extrato hidrossolúvel de soja e suco de uva, submetida a diferentes doses de radiação gama.

4-REVISÃO DE LITERATURA

4.1- Soja: origem e histórico

O cultivo da soja permaneceu restrito apenas aos países orientais por séculos, sendo usado na preparação de grande variedade de alimentos frescos, fermentados e secos (MORAIS; SILVA, 1996). Apenas após a chegada dos primeiros navios europeus no final do século XV e início do século XVI, é que foi trazida para o Ocidente (COODETEC, 2008).

No Brasil, a soja começou a ser cultivada provavelmente em 1882. Com a chegada dos primeiros imigrantes japoneses ao Brasil em 1908, a cultura foi introduzida no Estado de São Paulo e em 1914 no Rio Grande do Sul, mas o seu plantio apenas expandiu-se rapidamente no final dos anos 60 (SOUZA *et al.*, 2000).

Os principais modos de utilização da soja foram inicialmente adubação verde e, mais tarde, fonte de óleo comestível, ração animal e matéria-prima da indústria de alimentos, cosméticos, medicamentos e tintas (FEDERIZZI, 2008).

4.2- Botânica

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é pertencente à divisão Spermatophyta, subdivisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leguminosae (Fabaceae) que inclui, aproximadamente 600 gêneros e 13000 espécies. A família Leguminosae é constituída de três sub-famílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Faboideae (Papilionoideae). A sub-família Faboideae, é a maior delas, com cerca de 400 gêneros amplamente distribuídos, dentre eles estão o *Glycine* (soja), *Phaseolus* (feijão), *Pisum* (ervilha), *Arachis* (amendoim), *Lens* (lentilha), entre outros (JOLY, 2002).

4.3- Mercado

A produção de soja no mundo foi de 312,6 milhões de toneladas na safra 2014/2015. Os maiores produtores mundiais dessa cultura são os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina, com produção de 107,70; 96,24 e 55,0 milhões de toneladas, respectivamente (SEAB, 2015).

A América do Sul confirma sua importância no mercado mundial de soja, com cerca de 50% da produção mundial no período 2014/2015. Segundo os números mais recentes, Brasil, Argentina e Paraguai estimam produção em torno de 157 milhões de toneladas (SEAB, 2015).

As exportações brasileiras de soja chegaram na safra (2014/15) a 48 milhões de toneladas. Os maiores países importadores de soja brasileira são China (72%), Espanha (5%), Holanda (4%), Tailândia (3%) e Estados Unidos (2%) (SEAB, 2015). Destacando-se a China com importação em torno de 32 milhões de toneladas de soja brasileira (CONAB, 2015).

No Brasil, na safra 2013/14, a cultura ocupou uma área de 30,17 milhões de hectares, o que totalizou uma produtividade de 2,85 T ha⁻¹ e produção de 86,27 milhões de toneladas. A estimativa em dezembro de 2015 de produtividade para a safra 2014/2015 é de 2,99 T ha⁻¹, ocupando uma área de 32,09 milhões de hectares. A região centro-oeste se destaca com maior produção de soja no Brasil (43,97 milhões de toneladas), sendo o Mato Grosso o estado mais representativo, com 28,02 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

4.4- Composição química

A soja é considerada alimento de alto valor nutritivo e de grande importância na alimentação humana, constituindo excelente fonte de ácido graxo polinsaturado e proteína, além de conter compostos fenólicos (especialmente as isoflavonas), tocoferol, carotenoides, vitaminas e minerais (WHENT *et al.*, 2011)

Os grãos de soja possuem ácidos graxos polinsaturados e compostos fitoquímicos como isoflavonas, saponinas, fitatos, além de fosfolípidios, antioxidantes, fibras, dentre outros. Também é uma fonte de minerais, como o cobre, zinco, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês e vitaminas do complexo B (EMBRAPA, 2007a).

Sua importância econômica e nutricional é devida ao elevado teor de lipídios e proteínas que são responsáveis por cerca de 60% do peso seco da soja, sendo o restante composto por carboidratos, cinzas, fibras solúveis e insolúveis (ESTEVEZ *et al.*, 2010). Segundo Silva *et al.* (2006) a composição química de 100 gramas de soja apresentou 451,6 (Kcal g⁻¹) de caloria, 40,4 g de proteína, 24,55 g de lipídios, 17,26 g de carboidratos, 9,31 g de fibras totais e 2,88 g cinzas. Já em De Barros *et al.* (2014), dentre as cultivares de soja analisadas (BRS-213, BRS-258 e EMBRAPA-48), a BRS-213 apresentou 35,1 g de proteína, 21,6 g de lipídios, 22,7 de carboidratos, 16,0 g de fibras e 4,7 de cinzas. Demonstrando que a composição centesimal da cultivar analisada por Silva *et al.* (2006) apresentou porcentagens diferentes dos parâmetros avaliados na cultivar analisada por De Barros (2014).

Embora a soja apresente riqueza dos componentes nutricionais e bioativos, no Brasil e em alguns países ocidentais, o consumo humano de produtos derivados da soja é limitado pela presença dos compostos fitoquímico (ácido fítico, saponinas, beta-glicosidases, isoflavonas, etc), e da lipoxigenase, enzima capaz de catalisar reações sobre os ácidos graxos polinsaturados, metabolizando substâncias com sabor e aroma desagradáveis. Por outro lado, já foram desenvolvidas novas cultivares livres de lipoxigenase, cujo objetivo foi melhorar o sabor e superar problemas de oxidação, mantendo estáveis os ácidos graxos (ESTEVEZ *et al.*, 2010).

4.5- Fatores nutricionais e antinutricionais

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, definindo que os alimentos funcionais são aqueles consumidos como parte da dieta usual, que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos e/ou capacidade de reduzir o risco a doenças, além de possuírem funções nutricionais básicas (BRASIL, 1999).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) fornece uma lista de produtos que promovem benefícios à saúde. Trata-se de substâncias com propriedades funcionais, sendo novos alimentos ou ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. A lista faz referência à proteína de soja, constando a seguinte frase: “o consumo diário de no mínimo 25 g pode ajudar a reduzir o colesterol” (BRASIL, 2008).

A soja é considerada alimento funcional porque, além de funções nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde. Tal característica é atribuída principalmente a presença de proteína e dos fitoquímicos (isoflavonas, tocoferol, fitoesteróis), compostos com elevado potencial antioxidante, responsáveis por evitar a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Sendo estudada como alimento capaz de reduzir o risco de câncer de mama e próstata, osteoporose, doenças cardiovasculares e sintomas da pós-menopausa, além da redução da concentração sérica de colesterol e triglicerídeos (DIXIT *et al.*, 2010).

As fibras da soja exercem importante papel na regulação dos níveis de glicose no sangue, pois retarda a sua absorção, auxiliando no controle de diabetes, principalmente do tipo II. Estudos indicam que os fitormônios, conhecidos como isoflavonas ou isoflavonóides, atuam como antioxidantes, reduzindo o nível de colesterol ruim (LDL) no sangue e, conseqüentemente, influenciando na redução de doenças cardiovasculares (WONG *et al.*, 2008). Além disso, as isoflavonas podem exercer também atividade hormonal, equilibrando a quantidade do hormônio estrógeno no organismo feminino, amenizando os sintomas da menopausa, tais como insônia, sudorese, ondas de calor, ansiedade, perda de massa óssea, dentre outros (GUERREIRO, 2006).

Embora esteja presente em grande quantidade, a qualidade da proteína da soja não se iguala totalmente à qualidade das proteínas animais, como as carnes, ovos, leite e derivados (LOPES, 2003), sendo deficiente apenas em relação aos aminoácidos sulfurados – metionina e cistina, devendo ser complementada com outras fontes proteicas vegetais, como o arroz, o milho e o trigo (EMBRAPA, 2015b).

Os fatores antinutricionais conhecidos na soja são: inibidores de proteases que atuam como anti-enzima, inibindo a enzima digestiva tripsina e quimotripsina, aumentando a necessidade de minerais (em parte devido à ação quelante do fitato) e vitaminas; hemaglutinina que promove aglutinação dos glóbulos vermelhos do sangue; fator bocigênico que é responsável pela hipertrofia da glândula tireóide; saponinas que são responsáveis pela ruptura de eritrócitos; fitatos que podem reduzir a biodisponibilidade e absorção de íons metálicos importantes para a fisiologia (ou metabolismo) humana, além de comprometer a absorção proteica; estaquinose e rafinose são oligossacarídeos não metabolizados pelo homem (DIXIT *et al.*, 2011; TASHIMA; CARDELLO, 2003).

4.6- Extrato hidrossolúvel de soja (EHS)

A legislação (Resolução CNNPA n. 14, de 28 de junho de 1978) define o EHS “Leite de Soja” como sendo o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial (BRASIL, 1978; GIRI; MANGARAJ, 2012).

Atualmente, os principais métodos de produção do EHS são: moagem a frio (tradicional), moagem a quente, branqueamento dos grãos de soja com moagem a quente e o método canadense, que realiza a trituração com ausência de oxigênio. E para garantir a inibição dos componentes antinutricionais e a manutenção da qualidade organoléptica e nutricional do EHS, utiliza-se em conjunto aos métodos de produção algumas tecnologias, tais como: utilização de campo elétrico pulsado, membrana de separação, ultrassom, processamento por alta pressão (*high-pressure*) e homogeneização por elevada pressão (*ultra high-pressure*) (GIRI; MANGARAJ, 2012).

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005b) estabelece a partir da resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005, que o EHS deve apresentar um máximo e mínimo de proteína (N x 6,25) de 41,50% e 3,00%, respectivamente.

O EHS é uma bebida que se assemelha ao leite de vaca quanto a cor, textura, e ao valor nutritivo (BOATTO *et al.*, 2010), com exceção de algumas substâncias e ao teor de cálcio (CASÉ *et al.*, 2005). É uma bebida de baixo custo, e de fácil obtenção, dessa forma representa uma importante alternativa para a alimentação das populações desnutridas (GUERREIRO, 2006). É bebida alternativa aos portadores de intolerância à lactose. Constitui boa fonte protéica, podendo ser utilizado na prevenção e correção da desnutrição infantil (MAIA; ROSSI; CARVALHO, 2006).

A partir do lançamento, em 1997, de bebidas a base de soja no mercado brasileiro, observou-se consumo crescente deste tipo de produto. Nos últimos anos, as substâncias a base de soja em geral e particularmente o EHS têm despertado o interesse da população pelo seu consumo, devido principalmente às suas propriedades nutricionais. O produto industrializado pode ser encontrado no Brasil na forma original (sem aromatização), aromatizado com diferentes sabores e, ainda, adoçado com sacarose ou edulcorantes como a sucralose (TASHIMA; CARDELLO, 2003; GUERREIRO, 2006).

A bebida mista de soja e sucos de frutas merece destaque em função da ampla variedade ofertada. A mistura de EHS com sucos de frutas tem obtido ótimo resultado em termos de aceitação pelos consumidores (VALIM et al., 2003), pois o suco de fruta e o extrato de soja agregam a bebida mista características sensoriais desejáveis das frutas com as propriedades funcionais da soja e do fruto (MORALES-DE LA PEÑA *et al.*, 2010b). O consumo da bebida mista continua em expansão, indicando possíveis mudanças na atitude dos consumidores em relação aos produtos (BEHRENS; SILVA, 2004).

Apesar da crescente oferta de sabores diferenciados, as bebidas mistas disponíveis no mercado nacional fornecem quantidade de proteína de soja relativamente baixa (de 0,6 a 1,4%). Característica associada às dificuldades tecnológicas de produção, pois quando se trabalha com percentuais proteicos mais elevados, a bebida torna-se menos homogênea, pela floculação proteica, agregando aspectos sensoriais negativos (RODRIGUES, 2008).

A crescente busca da população por alimentos saudáveis impulsiona as pesquisas visando o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de contribuir ou manter o valor nutricional do alimento, sem acarretar perdas na qualidade sensorial, além de um produto seguro ao consumidor e com a mínima geração de resíduos danosos ao meio ambiente. (COMARELLA *et al.*, 2012).

4.7- Frutos

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção em torno de 40 milhões de toneladas ao ano, participando com apenas 2% do comércio mundial do setor, o que demonstra o forte consumo interno. Nas opções de oferta ao mercado externo estão mais de 20 espécies, encaminhadas a mais de 50 países. (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014). Uma das alternativas mais promissoras para o aproveitamento da fruta é a produção de sucos (LÓPEZ, 2004) e utilizá-lo como ingrediente em sorvetes, iogurtes, alimentos infantis, etc. (PRATI *et al.*, 2005)

Frutos e vegetais frescos cresceram em popularidade comparados aos produtos industrializados (MERMELSTEIN, 2001; KORHONEN, 2002), tal fato é explicado por atribuírem aos compostos bioativos (vitaminas E e C, carotenóides e

polifenóis) a capacidade de protegerem o organismo dos efeitos nocivos dos radicais livres, reduzindo o risco de doenças como o câncer (SERAFINI, 2001).

4.8- Suco de uva

As variedades de *Vitis labrusca* L. e seus híbridos constituem a base da produção de vinhos de mesa e de suco de uva no Brasil e representam mais de 85% do volume de uvas industrializadas no país (CAMARGO *et. al.*, 2005).

Entre as frutas, a uva é uma das que apresentam maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e taninos (FRANCIS, 2000). O resveratrol tem atividade antioxidante através da inibição da atividade dioxigenase da lipoxigenase (SÉFORA SOUSA; DE ANGELIS PEREIRA, 2013).

A composição química dos sucos de uvas pode variar em função da cultivar, variedade, clima, solo, entre outros fatores. Mas geralmente contêm quantidades apreciáveis de açúcar (glicose e frutose), ácidos (tartárico, málico e cítrico), minerais (potássio, sódio e cálcio), vitaminas (A, B6 e C) e polifenóis (RIZZON; LINK, 2006).

O suco de uva, dependendo do processo de obtenção, pode ser classificado como suco de uva concentrado, reprocessado ou reconstituído, desidratado, integral e adoçado. O suco integral é obtido da uva por meio de processos tecnológicos adequados, sem a adição de açúcares e na sua constituição natural (BRASIL, 2010).

O suco de uva deve apresentar em sua composição teor mínimo de sólidos solúveis de 14 °Brix, acidez total mínima de 0,41g 100 mL⁻¹ e açúcares totais naturais um máximo de 20,0 g 100 mL⁻¹ (BRASIL, 2000; 2010), apresentando equilíbrio entre sólidos solúveis, acidez titulável e alto teor de matéria corante (GUERRA; TONIETTO, 2003).

Segundo o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade de suco de uva (Instrução Normativa Nº 1, de 07 de janeiro de 2000) são fixados máximos e mínimos de alguns componentes presentes no suco integral de uva, apresentando um limite de variação do teor de sólidos solúveis (°Brix), da densidade, da acidez total e volátil, expressa em gramas de ácido tartárico (g 100 mL⁻¹), dos sólidos insolúveis (%), dos açúcares totais (%) e do “Ratio”, razão dos sólidos solúveis com a acidez total, (BRASIL, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Limites da composição físico-química de suco integral de uva, estabelecidos pela legislação*.

| Análises | Suco integral de uva | |
|---|----------------------|--------|
| | Máximo | Mínimo |
| Densidade (20/20 °C) | - | 1,057 |
| Sólidos solúveis (°Brix) | - | 14 |
| Acidez total (g de ác. Tartárico 100 mL ⁻¹) | 0,9 | 0,41 |
| Acidez volátil (g de ác. acético 100 mL ⁻¹) | 0,050 | - |
| “Ratio” | 45 | 15 |
| Sólidos insolúveis (%) | 5 | - |
| Açúcares totais (g 100 mL ⁻¹) | 20 | - |

(BRASIL, 2000; 2010). * A legislação trata-se da instrução Normativa N° 1, de 07 de janeiro de 2000 e da Portaria n° 259, de 31 de maio de 2010

O suco de uva é uma fonte representativa de compostos fenólicos e os muitos estudos demonstraram que o seu consumo está associado a vários benefícios a saúde dos consumidores. Dessa forma, há uma preocupação com os determinados tratamentos que a uva e o mosto são submetidos durante a produção do suco, os quais podem interferir na quantidade destes compostos. Os principais tratamentos são: método de extração, tempo de contato entre o suco e as partes sólidas da uva (casca e sementes), prensagem, tratamentos térmicos, enzimáticos, adição de dióxido de enxofre e ácido tartárico (LIMA *et al.*, 2015).

Rizzon e Link (2006), Borges *et al.* (2011) e Bresolin *et al.* (2013), Dutra *et al.* (2014) utilizaram o método de arraste a vapor para produzir suco de uva. Técnica que já vem sendo utilizada há muitos anos desde que se derivou do método Welch considerado o primeiro processo de extração através do calor (variando entre 60 a 90 °C), desenvolvido em 1869 por Thomas Welch (MARZAROTTO, 2010). A extração a quente contribui para uma maior concentração de fenólicos, inativação de enzimas e estabilidade microbiológica no suco (RIZZON; LINK, 2006). Entretanto, o uso de altas temperaturas durante a extração, pasteurização e estocagem pode acarretar perdas na quantidade de compostos fenólicos, principalmente devido à degradação de antocianinas (MALACRIDA; MOTTA, 2006).

Durante o armazenamento podem ocorrer mudanças no aroma, cor e sabor do suco devido à redução na concentração de antocianinas monoméricas e formação de pigmentos poliméricos. As reações responsáveis por essas transformações

incluem, frequentemente, a condensação direta entre antocianinas e flavonóis e a polimerização das próprias antocianinas (MALACRIDA; MOTTA, 2005; WROLSTAD; DURST; LEE, 2005).

4.9- Aditivos

Atualmente, existe uma diversidade de aditivos disponíveis no mercado. O Decreto nº 50.040 dispõe normas técnicas para o uso de aditivos químicos. Assim, consideram-se aditivos para alimentos (corantes, flavorizantes, antioxidantes, espumíferos, umectantes, estabilizantes, edulcorantes, conservador, anti-umectante, acidulante e espessante) as substâncias ou misturas de substâncias, dotadas ou não de poder alimentício, acrescentadas aos alimentos com a finalidade de lhes conferir ou intensificar o aroma, a cor, o sabor ou modificar seu aspecto físico geral ou ainda prevenir alterações indesejáveis (BRASIL, 1961).

O limite de uso dos aditivos, segundo as Boas Práticas de Fabricação, é denominado "*quantum satis*", ou seja, deve-se utilizar a quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem afetar a identidade e genuinidade do alimento, seu uso não pode resultar em práticas enganosas e a função deve condizer ao alimento em questão. Entretanto, estão estabelecidos em regulamentos técnicos específicos, alguns aditivos que podem ser usados dentro de limites máximos para cada alimento, (BRASIL, 1999a). O aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado aos alimentos intencionalmente, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do alimento, sem prejudicar o seu valor nutricional (VELOSO, 2009).

A ANVISA aprovou o regulamento técnico (RDC nº 25, de 15 de fevereiro de 2005) para o uso dos aditivos alimentares em bebidas não alcoólicas à base de soja ou alimentos com soja líquidos, estabelecendo suas funções e limites máximos. Podendo-se adicionar a essas bebidas acidulantes, antiespumante, antioxidante, aromatizante, conservador, corante, espessante, estabilizante, espumante, realçador de sabor, regulador de acidez, umectante e sequestrante (BRASIL, 2005c);

Os aditivos estão sendo amplamente pesquisados, por estarem presentes em inúmeros alimentos processados, são associados a desencadear doenças como o câncer de mama, ovário, estômago, esôfago, cólon e reto, do aparelho respiratório, diabetes, neoplasias, déficit de atenção com hiperatividade; hipersensibilidade alimentar,

entre outras (POLÔNIO; PERES, 2009). Dessa forma, a melhor alternativa é a substituição dos aditivos sintéticos pelos naturais, que ainda agregam características funcionais aos alimentos. Alguns aditivos naturais como o tocoferol e o ácido ascórbico já são amplamente utilizados pelas indústrias de alimentos, outros são considerados próbióticos, tais como frutooligossacarídeos, inulina, goma acácia (arábica), dentre outros (SCHIAVÃO-SOUZA *et al.*, 2007).

Os estabilizantes mantêm as propriedades físicas dos alimentos, mantendo a homogeneidade dos produtos e impedindo a separação dos diferentes ingredientes que compõem sua fórmula, e ainda aumentando a viscosidade. Diversos materiais poliméricos podem ser utilizados como estabilizantes/espessantes e sua origem pode ser vegetal ou microbiana. Entre os polissacarídeos, estão o amido, a pectina, a carragenana, os alginatos, carboximetilcelulose, a goma xantana, gelana, guar e arábica (TONELI; MURR; PARK, 2005). A goma arábica (acácia) também é muito empregada como estabilizante e emulsificante na indústria alimentícia e, além disso, é considerada fibra solúvel, apresenta grande influência na absorção de nutrientes, e está associada à redução das concentrações séricas de colesterol e triacilgliceróis (MELO *et al.*, 2008).

A Carboximetilcelulose (CMC), a goma guar e arábica apresentam propriedade espessante, estabilizante e emulsificante. A CMC é indicada para bebidas ácidas em função da sua estabilidade a pH ácido (CALEGUER; BENASSI, 2007). A goma acácia e guar dissolvem-se em soluções frias e quentes. A mistura de polissacarídeos na formulação de alimentos pode resultar em interações sinérgicas desejáveis, levando a propriedades reológicas melhoradas, sugerindo maior qualidade dos produtos (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Os mecanismos funcionais dos antioxidantes têm sido amplamente estudados. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes podem evitar a oxidação enzimática, decorrentes pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada polinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

4.10- Conservação e Irradiação

Os métodos mais utilizados para aumentar a vida útil dos alimentos são a conservação pelo calor, pelo frio, por controle de umidade, por adição de solutos, por defumação, por fermentação, por aditivos químicos e por radiação (EVANGELISTA, 2000).

Os métodos de conservação de alimentos pelo calor (pasteurização, esterilização, branqueamento e apertização) são capazes de inibir ou desnaturar enzimas indesejáveis e eliminar microrganismos (FARO; ARDITO; BORGO, 2002). Entretanto, temperaturas baixas que não interferem na qualidade nutricional e organoléptica dos alimentos, apenas destroem alguns grupos de microrganismos, como os psicrófilos e mesófilos não esporulados, não eliminando os termófilos e formas esporuladas (EVANGELISTA, 2000). Dessa forma, a conservação pelo calor, muitas vezes, pode ser combinada com outros métodos de conservação (POTTER; HOTCHKISS, 1995).

A irradiação, dependendo da dose utilizada, é um processo físico comparável à pasteurização ou esterilização, onde o alimento embalado ou não, é submetido a um dos três tipos de energia ionizante: raios gama, raios X ou feixe de elétrons. Em 1983, a Comissão do *Codex Alimentarius* concluiu que alimentos irradiados com dose abaixo de 10 kGy não apresentavam risco toxicológico posterior aos resultados de vários experimentos. Além disso, organizações internacionais como o Fundo das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliaram várias destas pesquisas e concluíram que a irradiação de alimentos é segura e benéfica (IRRADIAÇÃO DOS ALIMENTOS, 2011).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou, mediante a RDC n. 21 de 26 de janeiro de 2001 o regulamento técnico para irradiação de alimentos, estabelecendo que qualquer alimento pode ser tratado por radiação desde que a dose mínima absorvida seja suficiente para atender a finalidade pretendida e a dose máxima absorvida seja inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou os atributos sensoriais do alimento, não sendo estipulado valor numérico máximo para a dose permitida (BRASIL, 2001a).

A aplicação da técnica de irradiação em alimentos é utilizada para estender a vida útil e evitar problemas fitossanitários em produtos consumidos *in natura* ou processados, inibindo brotações, matando insetos e microrganismos (GROLICHOVA; DVOŘÁK; MUSILOVA, 2004).

A dose de radiação gama, aplicada aos alimentos, pode ser dividida em radurização (0,05 a 1,0 kGy), radicação ou radiopasteurização (1,0 a 10,0 kGy) e radapertização ou esterilização comercial (10,0 a 70,0 kGy) (JAY, LOESSNER, GOLDEN 2005; FELLOWS, 2006). Na radurização, as doses utilizadas são baixas, cuja finalidade é inibir brotamentos (batata, cebola, alho, etc), retardar o período de amadurecimento das frutas, deterioração fúngica em frutas e hortaliças, e de controlar infestação por insetos e ácaros em cereais, farinhas, frutas, etc. Na radicação, as doses são intermediárias, sua função é semelhante a de pasteurizar sucos, de retardar a deterioração de carnes frescas, entre outras. Na radapertização as doses são elevadas e utilizadas na esterilização de carnes, chás, temperos, dietas e outros produtos processados (CENA, 2015a).

Além dos efeitos benéficos relacionados anteriormente, a irradiação quando utilizada como técnica de conservação de alimentos permite algumas vantagens, como o processo ser a frio, que além de evitar danos causados pelo aumento de temperatura aos alimentos, possibilita a irradiação de produtos resfriados e congelados. A possibilidade de submeter grande quantidade e variedade de alimentos as diferentes doses de radiação. Evitar a recontaminação do alimento, pois durante o processo o mesmo já pode estar embalado. Alimentos em embalagens termossensíveis podem ser tratados, por não haver aumento da temperatura. Aumento na vida útil de frutas frescas, vegetais e carnes, espaçando o tempo de distribuição desses produtos. Redução do tempo de cozimento de alguns alimentos, principalmente os desidratados. Utilizado como substituto de tratamentos químicos, que poderiam deixar resíduos. A salmonelose e a campilobacteriose são doenças oriundas normalmente de produtos avícolas e a irradiação tornou-se um tratamento efetivo para eliminar as bactérias patogênicas causadoras dessas doenças. A radiação elimina os ovos e larvas de insetos presentes em alimentos sem prejudicar a qualidade dos mesmos (CENA, 2015b).

Alguns relatos na literatura alegam que a irradiação pode induzir o aumento do teor das isoflavonas, fenóis, antocianinas e das propriedades antioxidantes. Além de inibir a lipoxigenase, foi capaz de reduzir os inibidores de tripsina, e aumentar a sacarose pela quebra glicosídica dos oligossacarídeos em diferentes cultivares de soja (DIXIT *et al.*, 2010, 2011). Os componentes antinutricionais da soja sofreram redução com o aumento da dose de radiação (TOLEDO *et al.*, 2007). Oligossacarídeos da família rafinose, responsáveis por causar flatulência foram reduzidos em 82% em grãos de soja irradiados a 10 kGy (YUN *et al.*, 2012). Tewari *et al.* (2014) alegaram redução de

substâncias responsáveis pelo *off flavor* com o aumento do potencial antioxidante desencadeado por baixas doses de radiação em grão de soja.

Os efeitos da irradiação sobre as frutas e hortaliças minimamente processadas foram estudados a partir de diferentes aspectos, como para estender a vida útil de gengibre fresco (MISHRA; GAUTAM; SHARMA, 2004), de suco de cenoura e couve (SONG *et al.*, 2006), de caldo de cana (MISHRA; GAUTAM; SHARMA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2007), de romã (ALIGHOURCHI; BARZEGAR; ABBASI, 2008) e de suco de couve fresca (KIM *et al.*, 2007). Além disso, apresentou melhoria da cor e aumento dos antioxidantes de vários produtos alimentares (JO *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2006).

Entretanto, doses acima de 5 kGy podem alterar o aroma de grãos de soja (YUN *et al.*, 2012), bem como doses entre 3,5 a 10 kGy reduziram o teor de antocianinas totais de suco de romã (ALIGHOURCHI; BARZEGAR; ABBASI, 2008). Doses entre 1,5 a 3,0 kGy interferiram na qualidade sensorial de suco de laranja, alterando a cor, sabor e grumosidade da bebida (VERRUMA-BERNARDI; SPOTO, 2003). Embora haja diversos relatos abordando a aplicação da radiação em alimentos e bebidas, ainda se faz necessário encontrar para vários alimentos a dose específica que contribua com a redução ou elimine a carga microbiológica, mantendo ou melhorando a qualidade nutricional, sem que haja alterações organolépticas.

5-MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Material

Para o experimento 1, utilizou-se grãos de soja específicos para uso culinário, sendo todos cultivares EMBRAPA: BRS-213, BRS-258 e EMBRAPA-48. Os grãos foram fornecidos pela EMBRAPA – Soja, sediada em Londrina, PR. Tais cultivares apresentam características adequadas para alimentação humana, como sabor suave, hilo claro, proporcionando melhor coloração para os processados e elevado teor de proteína (EMBRAPA, 2011). Além disso, a cultivar BRS-213 é livre das isoenzimas lipoxigenases, resultado de melhoramento genético realizado a partir de cruzamentos naturais de espécies diferentes da leguminosa (EMBRAPA, 2015).

Nos demais experimentos apenas o cultivar BRS-213 foi utilizado para a produção dos EHS, o qual foi selecionado a partir dos resultados das análises realizadas no experimento 1.

Para adoçar as bebidas utilizou-se o suco concentrado de maçã clarificado (Figura 1), produzido pela Tecnovin do Brasil Ltda (Bento Gonçalves, RS).



Figura 1. Suco concentrado de maçã clarificado.

A bebida mista foi composta pelo EHS e suco de uva tinta. O suco foi produzido artesanalmente em panela extratora a vapor a partir da variedade de uva Isabel Precoce. A produção do suco de uva foi realizada no laboratório de bioquímica (Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP).

O EHS e a bebida mista, produzidos nos experimentos desse estudo, foram suplementados com os aditivos goma acácia/arábica, guar e carboximetilcelulose em conjunto (sinergismos), a fim de melhorar o potencial estabilizante (TONELI; MURR; PARK, 2005) sobre as bebidas, evitando a floculação proteica ao se adicionar o suco de uva, o qual contém ácido ascórbico e tartárico. Os antioxidantes, ácido ascórbico e tocoferol (Figura 2), foram adicionados nas amostras do experimento 2, 3 (etapa 1) e 4 para evitar a oxidação gerada pelos tratamentos. O ácido benzóico (conservador) foi adicionado somente em algumas amostras do experimento 4. A essência de baunilha (aromatizante) foi adicionada nos experimentos 2, 3 (etapa 1) e 4 (Tabela 2).



Figura 2. Alfa-tocoferol (antioxidante) utilizado para suplementar o EHS.

Tabela 2. Aditivos para alimentos e bebidas aprovados pela ANVISA, segundo as boas praticas de fabricação, utilizados para suplementar as amostras produzidas nos experimentos.

| Aditivos | Função | ANVISA |
|-----------------------------|--|---------------|
| Tocoferol | Antioxidante | BRASIL, 2005 |
| Ácido ascórbico | Antioxidante | BRASIL, 1999 |
| Goma acácia/arábica | Estabilizante/espessante/emulsificante | BRASIL, 1999 |
| Goma guar | Estabilizante/espessante/emulsificante | BRASIL, 1999 |
| Carboximetilcelulose sódica | Estabilizante/espessante/emulsificante | BRASIL, 1999 |
| Ácido benzoico | Conservador | BRASIL, 2005 |
| Baunilha (artificial) | Aromatizante | BRASIL, 2005 |

5.2-Métodos

Primeiramente foram descritos os métodos de produção (5.2.1) de cada bebida (EHS, suco de uva e a bebida mista de EHS e suco de uva) e nos subitens do planejamento experimental (5.2.2) foram detalhados os quatro experimentos realizados nesse trabalho. Abaixo foi descrito o esquema (Figura 3) que demonstra a sequência em que os experimentos foram realizados.

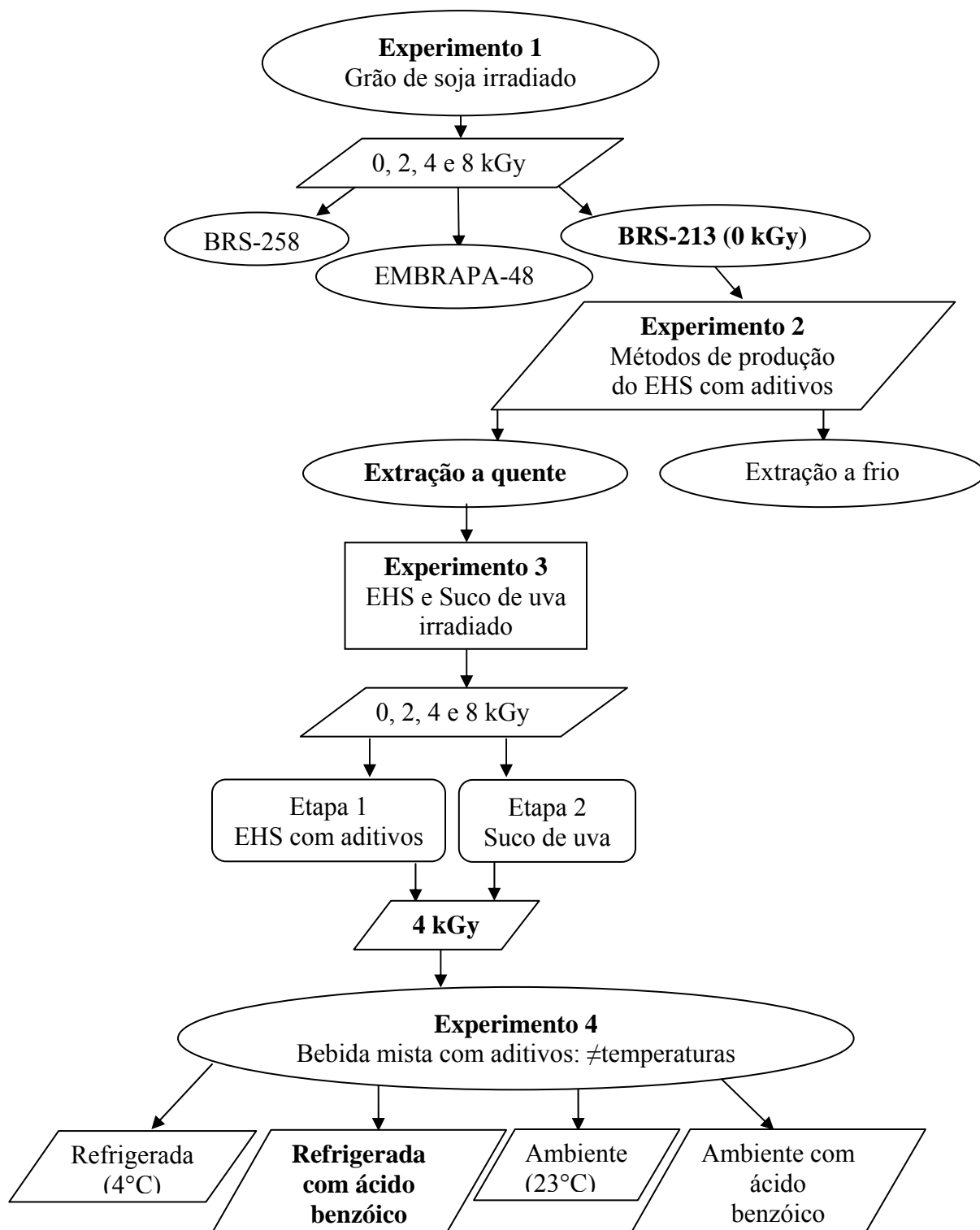


Figura 3: Esquema sobre o delineamento dos experimentos (1, 2, 3 e 4).

5.2.1- Produção das bebidas

a) Extrato hidrossolúvel de soja (EHS)

Para a produção dos EHS utilizou-se o cultivar de soja BRS-213 a partir de duas formas de processamentos: método tradicional-extração a frio (HOWELL; CALDWELL, 1978) e o método de Illinois com modificações-extração a quente (NELSON; STEINBERG; WEI, 1976). Ambos foram preparados na proporção de 1:6 (soja: água), incluindo basicamente imersão dos grãos em água (maceração), trituração, filtragem, cozimento e ajuste do volume final (NELSON; STEINBERG; WEI, 1976; WILKENS; MATTICK; HAND, 1967).

Após a obtenção do EHS a partir de ambos os métodos, houve a suplementação das bebidas com aditivos, sendo 3% da goma acácia/arábica (BRASIL, 1999), e 1% de liga neutra (guar e carboximetilcelulose) (BRASIL, 1999), 0,2% de essência de baunilha (BRASIL, 1999), 0,05g 100 mL⁻¹ tanto de tocoferol (BRASIL, 2005) como de ácido ascórbico (BRASIL, 1999). O EHS foi adoçado com suco concentrado de maçã (correção final: 14 °Brix de sólidos solúveis). A homogeneização dos aditivos foi realizada em liquidificador industrial.

Antes de iniciar a produção dos EHS todos os utensílios foram lavados e enxaguados com água destilada fervente e posteriormente com hipoclorito de sódio (2,5%) diluído, na proporção de 1 colher de sopa (15mL) para 1000 mL de água destilada.

• **Método tradicional (extração a frio):** Os grãos de soja (166,67 g) foram mantidos em béquer de vidro (2 L) com água destilada (833,35 mL) por 14 horas, na proporção de 1:5 (soja:água). Posteriormente, a água da maceração foi descartada e os grãos triturados, por aproximadamente 1 minuto, em liquidificador com água destilada fria (1000 mL), na proporção de 1:6 (soja: água). A pasta de soja obtida após a trituração foi filtrada em coador de tecido, separando o *okara* do EHS. Em seguida, o EHS foi transferido a uma leiteira de alumínio e aquecido a 90 ±5°C por 15 minutos em fogão industrial, a manutenção da temperatura foi controlada por termômetro culinário (Figura 4). A produção do EHS foi executada conforme proposto por Howell e Caldwell (1978), com modificações. Houve três repetições desse método.

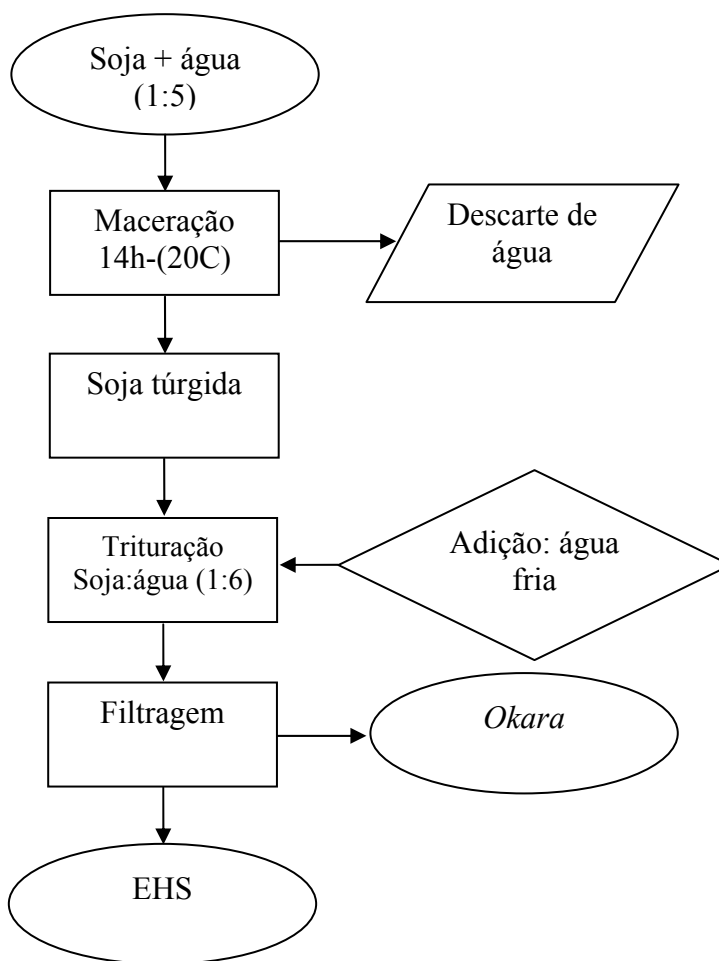


Figura 4. Fluxograma do método de processamento tradicional (moagem a frio).

• **Método de Illinois (extração a quente):** Os grãos de soja (166,67 g) foram transferidos para uma leiteira de alumínio com água destilada fervente (833,35 mL), na proporção 1:5 (soja:água), para o branqueamento ($90 \pm 5^\circ\text{C}$) dos grãos por 15 minutos em fogão industrial, o controle da temperatura foi realizado por termômetro culinário. Em seguida, a água do branqueamento foi descartada e os grãos levados para trituração, por aproximadamente 1 minuto, em liquidificador, com água fervente (1000 mL) na proporção 1:6 (soja:água). A pasta de soja obtida na trituração, a qual foi filtrada em coador de tecido, onde separou-se o *okara* do EHS (Figura 5). A produção do EHS foi desenvolvida conforme descrito por NELSON *et al.*, (1976).

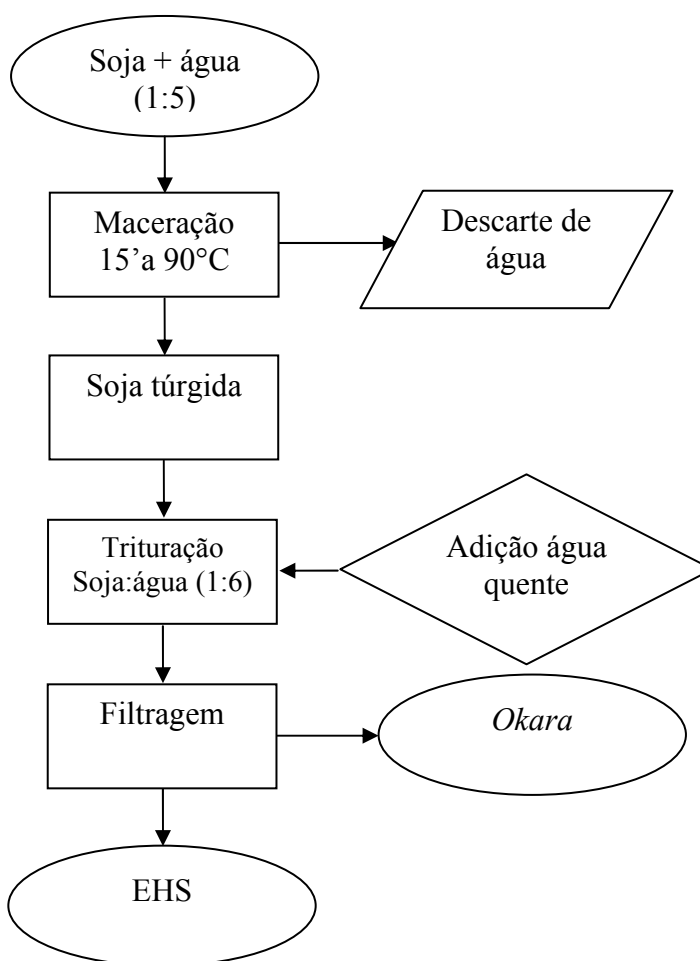


Figura 5. Fluxograma do método de processamento *Illinois*, com modificações (moagem a quente).

Os EHS foram adoçados na concentração de 14 °Brix com suco concentrado de maçã clarificado (BRUNELLI; VENTURINI FILHO, 2012). O suco concentrado de maçã apresentou teor de 85 °Brix de sólidos solúveis totais. Esse valor dos sólidos solúveis do suco concentrado foi utilizado para calcular as correções do teor dos sólidos solúveis do EHS e da bebida mista (14 °Brix).

Para a correção dos sólidos solúveis, utilizou-se o seguinte balanço de massa, conforme demonstrado na equação 1 abaixo:

$$S1.M1 + S2.M2 = S3.M3 \quad (1)$$

Onde: S1 = sólidos solúveis do EHS inicial; M1 = Massa do EHS inicial; S2 = sólidos solúveis do suco concentrado de maçã utilizado para correção; M2 = Massa do suco utilizado para a correção; S3 = sólidos solúveis do EHS final; M3 = Massa do EHS final.

Os EHS obtidos foram suplementados com os aditivos e em seguida armazenados em garrafas de vidro (1000 mL) e refrigerados a 4 °C. O EHS ficou armazenado sob refrigeração por cinco dias, tempo que foi necessário para obtenção dos resultados microbiológicos. Após a comprovação da qualidade fitossanitária da bebida realizou-se a análise sensorial.

b) Suco de uva tinta

A variedade de uva utilizada para extração do suco foi a Isabel Precoce, fornecida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). As mesmas foram colhidas e armazenadas em câmara fria ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) para extração do suco no dia seguinte.

As uvas (73 kg) foram lavadas, selecionadas (separação das uvas saudáveis das estragadas) e desengaçadas (separação do engaço dos bagos de uva) manualmente. Após a retirada do engaço e dos bagos estragados, restaram 60 kg de bagos saudáveis, os quais foram pesados em lotes de 3 kg.

Para a extração do suco utilizou-se a panela extratora a vapor, cuja capacidade máxima é 5 kg de bagos de uva. Cada extração do suco durou 1h e 50 minutos, foram 20 extrações, totalizando 37 horas. Realizou-se 10 extrações por dia.

Na panela extratora adicionou-se 3 kg de uva e 4,5 L de água destilada (o volume de água foi acrescentado aos poucos), a partir dessa proporção o rendimento foi aproximadamente de 2,5 L de suco para cada extração. Os sucos foram recolhidos em garrafas de vidro de 1000 mL, na temperatura de $80 \pm 5^\circ\text{C}$, lacrados com tampa de rosca, posteriormente foram armazenados a temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$. A técnica de produção do suco foi executada conforme proposto por Borges *et al.* (2011) e Dutra *et al.* (2014).

c) Bebida mista

O EHS produzido pelo método de extração a quente foi homogeneizado em liquidificador com 3% de goma acácia, produto doado pela empresa Nexira, 0,1% de liga neutra (goma guar e carboximetilcelulose), as quais possuem potencial estabilizante, emulsificante e espessante, segundo a legislação vigente (BRASIL, 1999); Em seguida, acrescentou-se tocoferol- vitamina E livre, (BRASIL, 2005c) e ácido ascórbico (BRASIL, 1999), ambos com propriedade antioxidante, na quantidade de 0,05g 100 mL⁻¹; 0,2% de essência de baunilha (aroma artificial) e o suco de uva tinta na proporção 1:1 (EHS: suco de uva), mantendo a mistura sob agitação no liquidificador por 2 minutos. A bebida mista foi adoçada a 14 °Brix de sólidos solúveis com suco concentrado de maçã clarificado e armazenada em garrafa de vidro de 1000 mL.

A correção dos sólidos solúveis foi realizada a partir do balanço de massas, conforme demonstrado na equação abaixo:

$$S1.M1 + S2.M2 = S3.M3 \quad (1)$$

Onde: S1 = sólidos solúveis da bebida mista inicial; M1 = Massa da bebida mista inicial; S2 = sólidos solúveis do suco concentrado utilizado para correção; M2 = Massa do suco utilizado para a correção; S3 = sólidos solúveis da bebida mista final; M3 = Massa da bebida mista final.

5.2.2 - Planejamento experimental

Para a realização do experimento 1, 3 e 4, referente à submissão das amostras a dosagens de radiação gama, firmou-se parceria com o Centro de Tecnologia das Irradiações do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), sediado na Universidade de São Paulo, Brasil. Utilizou-se o Irradiador Multipropósito de Cobalto 60, no qual emite radiação gama nas doses desejadas para este trabalho.

As doses de radiação gama utilizadas nos experimentos foram definidas de acordo com o limite permitido pela legislação (BRASIL, 2001a) e a partir de alguns trabalhos científicos envolvendo aplicação de radiação em soja e bebidas (ARJEH;

BARZEGAR; ALI SAHARI, 2015; DIXIT *et al.*, 2011; NARESH *et al.*, 2014; POPOVIT *et al.*, 2013)

Para os três cultivares de soja (experimento 1) foram realizadas as análises bioquímicas. As análises realizadas para as amostras do experimento 2, 3 e 4 foram: físico-química, bioquímica, microbiológica e sensorial.

5.2.2.1-Experimento 1 (Irradiação do grão de soja)

Os três cultivares de soja foram submetidos a quatro diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy), sendo ponto 0 denominado controle (ausência de radiação). Os grãos de soja foram embalados em recipientes de vidro, contendo 200g em cada recipiente. Foram separados três recipientes para cada dose de radiação, com os cultivares correspondentes. Dessa forma, nesse experimento delineou-se um fatorial 4 x 3, sendo 4 variáveis para cada cultivar de soja, com três repetições. Totalizando 36 parcelas experimentais.

A dose de radiação gama que elevou significativamente os resultados dos componentes bioquímicos, confirmados a partir das análises realizadas, foi aplicada ao cultivar de soja processado nos experimentos seguintes (experimento 2, 3 – etapa 1 e 4). Além disso, o cultivar de soja que apresentou melhores resultados bioquímicos foi selecionado para compor os próximos experimentos (2, 3-etapa 1 e 4).

5.2.2.2- Experimento 2 (Métodos de processamentos)

Nessa etapa foram utilizados dois métodos diferentes de processamento do extrato hidrossolúvel de soja (EHS): extração a frio (tradicional) e extração a quente (Illinois). O cultivar EMBRAPA (BRS-213) foi utilizado no processamento do EHS, selecionado a partir dos resultados obtidos no experimento anterior. O grão de soja não foi irradiado antes do processamento, pois os resultados bioquímicos realizados no experimento 1 indicaram estabilidade dos componentes independente da aplicação da radiação gama. Portanto, nesse experimento houve três repetições para cada tratamento (extração a quente x extração a frio), totalizando 06 parcelas experimentais.

O método de processamento que apresentou melhor perfil sensorial foi utilizado para a confecção do EHS dos experimentos seguintes, tal confirmação foi estabelecida a partir dos resultados obtidos na análise sensorial.

5.2.2.3- Experimento 3 (Irradiação do EHS e do suco de uva)

- Etapa 1- O EHS foi produzido pelo método de extração a quente com o cultivar BRS-213, engarrafado e submetido às dosagens de 0, 2, 4 e 8 kGy, sendo o ponto 0 denominado controle, amostra que não foi submetida a radiação gama. Dessa forma, foram quatro variáveis com três repetições, totalizando 12 parcelas experimentais.

- Etapa 2- O suco foi produzido em panela extratora a vapor a partir da variedade de uva Isabel Precoce, engarrafado e submetido às dosagens de 0, 2, 4 e 8 kGy. Sendo quatro dosagens distintas de irradiação gama com 3 repetições, totalizando 12 parcelas experimentais.

A dose que alcançou melhores resultados no painel sensorial, tanto da etapa 1 como da etapa 2, foi utilizada como técnica de conservação no experimento 4.

5.2.2.4- Experimento 4 (Conservação da bebida mista)

Os melhores tratamentos obtidos nos experimentos anteriores foram selecionados neste ensaio, cuja finalidade foi produzir uma bebida mista com melhor qualidade organoléptica e nutricional. Dessa forma, a bebida mista foi constituída por suco de uva produzido pela panela extratora a vapor com a variedade de uva Isabel precoce, e EHS que foi produzido pelo método de extração a quente com o cultivar de soja BRS-213, suplementado com aditivos (tocoferol, ácido ascórbico, essência de baunilha, goma acácia, guar e carboximetilcelulose).

As bebidas mistas de EHS e suco de uva apresentaram 14 °Brix de sólidos solúveis, essa concentração foi atingida a partir do suco concentrado de maçã clarificado.

Os tratamentos para as bebidas mistas foram condiciona-las a duas temperaturas de armazenamento e adicionar ou não conservante. Dessa forma, parte das bebidas foi mantida sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) e outra na temperatura ambiente ($23 \pm 3^\circ\text{C}$).

Em metade das amostras que ficariam condicionadas a temperatura ambiente e sob refrigeração, adicionou-se o conservante ácido benzóico na quantidade de $0,05\text{g } 100\text{ mL}^{-1}$ (BRASIL, 2005c).

Posterior a produção e envase das bebidas mistas, todas as amostras foram submetidas à dose de 4 kGy de radiação gama. Essa dose foi selecionada a partir das melhores notas obtidas na análise sensorial, realizada para as bebidas submetidas a diferentes doses de radiação gama (EHS e suco de uva), no experimento 3. As amostras mantidas na temperatura ambiente ficaram em armário fechado e com ausência de luz.

Dessa forma, os tratamentos foram:

Tratamento 1: Bebida mista mantida sob refrigeração ($4 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e sem adição de ácido benzóico;

Tratamento 2: Bebida mista mantida sob refrigeração ($4 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e com adição de ácido benzóico;

Tratamento 3: Bebida mista mantida na temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e sem adição de ácido benzóico;

Tratamento 4: Bebida mista mantida na temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e com adição de ácido benzóico.

Portanto, o delineamento foi um fatorial 2×2 , com 3 repetições, totalizando 12 parcelas experimentais. Esses tratamentos foram observados por 09 meses, a fim de definir a vida de prateleira da bebida mista.

As bebidas mistas foram produzidas para o mês inicial (ponto 0), mês 1, mês 3, mês 5, mês 7 e mês 9. Dessa maneira, houve 6 produções das bebidas mista para o tratamento 1 e 2, com três repetições cada, totalizando 36 processamentos. Já para o tratamento 3 e 4 foram realizadas 3 produções da bebida mista, com três repetições cada, totalizando 18 processamentos. Realizou-se menos produções da bebida mista para o tratamento 3 e 4 pois, como as amostras foram mantidas sob temperatura ambiente, foi previsto deterioração antecipada aos 9 meses proposto de vida de prateleira. Entre todos os tratamentos houve 54 processamentos de bebida mista.

5.2.3- Análises físico-químicas

a) Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS), suco de uva e bebida mista

As análises realizadas foram energia metabolizável (kcal), umidade, sólidos totais, proteínas, lipídios, cinzas, pH, acidez, “*Ratio*” (apenas para o suco de uva) e sólidos solúveis conforme Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a), carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956). Realizou-se, também, a análise da coloração (MINOLTA, 1994;1998).

b) Descrição das análises

• **Energia metabolizável:** foi calculada a partir dos resultados obtidos pela composição química centesimal das amostras, multiplicados pelos seguintes fatores de conversão: Carboidratos (exceto polióis) $4 \text{ kcal g}^{-1} - 17 \text{ kJ g}^{-1}$; Proteínas $4 \text{ kcal g}^{-1} - 17 \text{ kJ g}^{-1}$; Gorduras $9 \text{ kcal g}^{-1} - 37 \text{ kJ g}^{-1}$.

• **Umidade:** método de secagem em estufa, através da perda de peso da amostra aquecida a $105 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, até peso constante. Os cadinhos foram colocados em estufa, e retirados quando apresentaram peso constante. Antes da pesagem, foram colocados em dessecador, para perda de temperatura sem ganho de umidade. Em seguida, pesou-se 10 g de amostra nos cadinhos e foram colocados novamente em estufa. Quando o peso dos cadinhos estabilizou, foram transferidos ao dessecador para posterior pesagem final dos mesmos.

• **Sólidos totais:** subtraiu-se de 100% os resultados do teor de umidade. Logo, os teores de sólidos totais são: $100 - \% \text{ do teor de umidade}$;

• **Cinzas:** foram pesados 2g das amostras utilizando-se cápsulas de porcelana previamente taradas. Estas amostras foram desidratadas a $105 \pm 2 \text{ °C}$ por 12 h e em seguida foram mantidas em dessecador, para a posterior pesagem. Em sequencia as amostras foram carbonizadas em mufla a 550 °C por 4 h. Após resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente as amostras foram pesadas. O cálculo do percentual de cinzas foi efetuado por meio da seguinte expressão: $\% \text{ Cinzas} = [(S*100) / P]$

Onde: S = massa de cinzas (g); P = massa da amostra (g).

A diferença entre o peso do conjunto e o peso do cadinho vazio, expressa a quantidade de cinzas na amostra.

• **pH:** calibrar-se o potenciômetro com as soluções tampão pH 7 e 4. Adicionou-se 30 mL da amostra em béquer, contendo uma barra magnética (peixinho), e colocá-lo sobre um agitador magnético. Emergiu-se o eletrodo e o termômetro na amostra até fixar o valor do pH no visor digital.

• **Acidez titulável:** pipetar 10 mL da amostra e 100 mL de água em béquer. Colocar dentro do béquer a barra magnética, e o mesmo sobre o agitador magnético. Titular a solução de hidróxido de sódio padronizada (0,1N) até o ponto de viragem (pH 8,2-8,4), utilizando o potenciômetro.

• **“Ratio”:** é a razão dos sólidos solúveis (°Brix) da bebida com sua acidez titulável. Dessa forma, a equação do “Ratio” foi demonstrada da seguinte maneira: $R = \frac{\text{sólidos solúveis}}{\text{acidez titulável}}$.

• **Proteínas:** foi determinada pelo método de Kjeldahl, o qual quantifica o N orgânico total. Para conversão do N em proteína é necessário multiplicar o resultado pelo fator 6,25. O procedimento do método baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico para digestão até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados. Todo nitrogênio presente na amostra transformou-se em sulfato de amônio. Adicionou-se NaOH concentrado e aqueceu-se para liberação da amônia dentro do volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio. O borato de amônio formado é dosado com uma solução ácida (HCl) padronizada.

• **Lipídios:** pesou-se 2g de amostra em cartucho de papel-filtro e registrou-se o peso inicial dos balões (balões vazios) referentes a cada amostra.

O cartucho de papel de filtro foi colocado no recipiente de extração Soxhlet. Ao balão foi adicionado de 30 a 40 mL de éter de petróleo e colocado sob o condensador fixando-o ao anel de rosca. Ligou-se a água do condensador. Após completar a extração, foi removida a amostra do recipiente e colocado o tubo de vidro, coletor de éter, sob o condensador. Registrou-se o peso final do balão (balão com gordura). A diferença entre o peso final e o inicial do balão corresponde à massa da gordura extraída.

• **Carboidratos ou açúcares totais:** em tubos de ensaio de 10 mL pipetou-se de 10 a 100 μL da amostra, de 900 a 990 μL de água, 500 μL de solução de Fenol (5% w/v). Foram homogeneizadas as misturas e acrescentados lentamente 2,5 mL de ácido sulfúrico, agitou-se a solução novamente. Aguardou-se 20 minutos após a reação para se realizar a leitura em espectrofotômetro a 490 nM. Foi calculada a concentração de açúcares totais com uma curva padrão de glicose (1 mg mL^{-1}).

• **Análise da coloração (instrumental):** As bebidas foram submetidas ao colorímetro da marca Konica Minolta (Chroma meter, CR 400/410) em faixa de comprimento de onda de 380 a 780 nM. A cor foi expressa pelo sistema de coordenadas retangulares (L; a*; b*) conforme a CIE (Comission Internatinal de E'clairage), onde L expressa à luminosidade (0% = negro e 100% = branco), a* representa as cores vermelha (+) ou verde (-) e b* as cores amarela (+) ou azul (-), conforme Figura 6.

O índice c* (Chroma- saturação de cor) e o $^{\circ}\text{Hue}$ (ângulo de tonalidade cromática) são calculados a partir dos valores de a* e b*. O $^{\circ}\text{Hue}$ possui variação das cores, sendo : 0 a 18°(vermelho arroxeado), de 18 a 54° (vermelho), 54 a 90° (alaranjado), 90 a 126° (amarelo), 126 a 162° (amarelo esverdeado), 162 a 198° (verde), 198 a 234 (verde azulado), 234 a 270° (azul), 270 a 306° (roxo azulado), 306 a 342° (roxo), 342 a 360° (vermelho arroxeado). O índice c (Figura 7) perfaz as cores fracas e opacas as mais intensas e brilhantes.

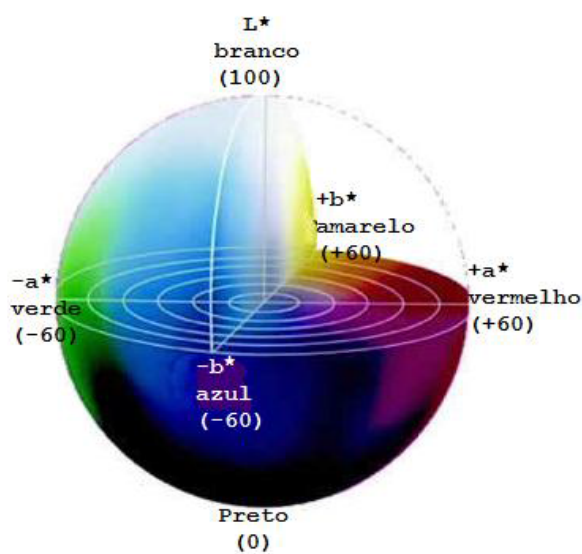


Figura 6. Representação da cor sólida no espaço $L^*a^*b^*$. Fonte: Adaptado de Minolta (1994).

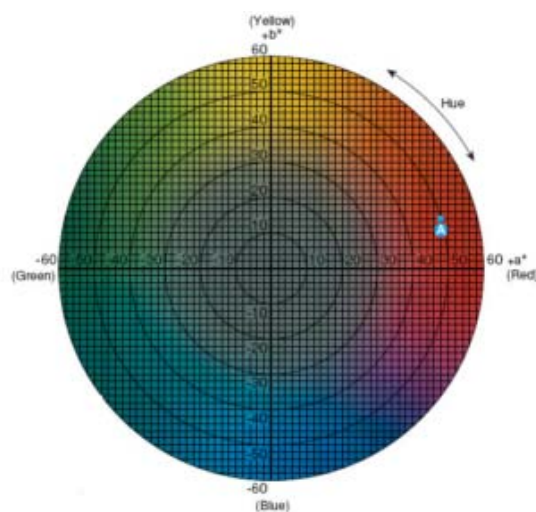


Figura 7. Diagrama de cromaticidade. Variação da saturação do índice c (0 a 60). Fonte: Konica Minolta (1998).

5.2.4- Análises Bioquímicas

a) Grãos de soja

Foram determinados os fenólicos totais (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999), flavonóides (VENNAT *et al.*, 1992) e capacidade antioxidante (BRAND- WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Enzima antioxidante: dismutase do superóxido (SOD), conforme metodologia descrita por Giannopolitis; Ries (1977).

Enzimas oxidativas: peroxidase (POD) e polifenoxidase (PPO), seguindo metodologia descrita por Clemente e Pastore (1998) e Robinson (1987), respectivamente.

b) EHS, Suco de uva e Bebida mista

Foram determinados os fenólicos totais (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999), flavonoides (VENNAT *et al*, 1992) e capacidade antioxidante (BRAND- WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

c) Descrição das análises

• **Dismutase do superóxido (SOD):** foi determinada pela adição de 100 μL de extrato enzimático bruto, a 3 mL de uma solução com L-metionina 13 mM, riboflavina 2 μM , cloreto azul de p-nitro-tetrazólio (NBT) 75 μM , e EDTA 100 nM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8. A reação aconteceu em uma câmara, sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15W, mantida dentro de uma caixa coberta com papel alumínio, a 25 °C. A reação, iniciada pela ligação da lâmpada, foi interrompida um minuto depois pelo desligamento da mesma. A atividade da SOD foi medida pela diferença no aumento da absorvância das amostras a 560 nM, subtraído de um "branco" ao qual o extrato enzimático bruto não foi adicionado. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir, em 50%, a fotorredução do NBT.

• **Peroxidase (POD):** determinou-se a enzima através da reação de 100 μL de extrato bruto com 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de Pyrogallol e 20 mM H_2O_2 . Após incubação por 1 min. a reação foi paralisada com 0,5 mL de H_2SO_4 (5%). A leitura da absorvância foi realizada a 420 nM; A atividade específica (μmol de H_2O_2 decomposto mg de proteína⁻¹) da enzima é calculada usando-se um coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, conforme descrito por Clemente (1998).

• **Polifenoxidase (PPO):** foi determinada de acordo com o método descrito por Robinson (1987). Ao tubo de ensaio foi adicionado 0,3 mL de extrato enzimático e 1,85 mL de catecol 0,1N. Levaram-se os tubos de ensaio para o banho-maria a 30 °C por 30 min. Após, adicionou-se 0,8 mL de ácido perclórico 2 N para posterior leitura das amostras a 395nm. A atividade da PPO foi expressa em μmol de catecol transformado mg de amostra⁻¹.

• **Compostos fenólicos:** em tubo de ensaio transferiu-se 0,3 mL de extrato aquoso (1 mL da amostra foi centrifugada com 10 mL de acetona 50%) , 0,7 mL de água, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, após 5 minutos adicionou-se 2,5 mL de carbonato de sódio a 20%. Os tubos ficaram em repouso por 1 hora, na ausência de luz, para posterior leitura em espectrofotômetro a 725 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão. O resultado foi expresso em equivalente grama de ácido gálico (EAG 100 mL⁻¹ de amostra);

• **Flavonoides:** aos tubos adicionou-se 1 g da amostra e 4 mL de metanol acidificado (ácido acético glacial 10%). Realizou-se a centrifugação, e ao sobrenadante foram adicionados 1 mL de cloreto de alumínio (5%). A reação perdurou por 30 minutos, em ausência de luz. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 425nm.

• **Capacidade antioxidante:** foi realizada pelo método do DPPH, o qual baseia-se na capacidade de compostos fenólicos em sequestrar o radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) em solução. Uma alíquota 0,5 mL do extrato foi adicionado a 3 mL de etanol 100% e 300 μL de solução DPPH (0,5 mM em etanol). A medida da absorbância foi a 517 nm (BRAND- WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).. O resultado foi expresso em μmoles equivalentes de trolox por 100 g amostra (TEAC 100g⁻¹).

5.2.5- Análises microbiológicas

A análise microbiológica foi realizada para contagem de *Salmonella sp*, coliformes (totais e termotolerantes), *Bacillus cereus* conforme exigido pela Anvisa (BRASIL, 2001b), além dessas, realizou-se análise para *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras e bactérias mesófilas utilizando-se metodologias descritas em Silva *et al.* (2001).

a) **Descrição das análises**

• ***Salmonella sp.***: inoculou-se 25 mL de amostra em 225 mL de água peptonada a 1%, tamponada e em seguida incubada à 35 °C, por 24 horas. Aliquotas de 10 mL do pré-enriquecimento foram transferidas para 90 mL de caldo Selenito Cistina e incubado a 42,5 °C por 24 horas em banho- Maria. A partir dos caldos de enriquecimento seletivo foram feitas estrias com o auxílio de alça de platina em placas contendo ágar Entérico Hektoen (HE) e ágar Salmonella-shigella (S-S) e incubadas à 35°C por 24 horas.

• **Coliformes totais**: realizou-se a primeira diluição em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%. As preparações das diluições decimais subsequentes foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente até 1/1000. Cada diluição foi semeada em três tubos, contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), para a quantificação do número mais provável de coliformes (NMP). As amostras ficaram em estufas a 35 °C por 48 h (prova presuntiva). Os tubos que apresentarem formação gasosa no interior dos tubos Duran são inoculados em caldo verde brilhante bile lactose 2% e incubados a 35 °C. A confirmação vem com nova formação de dióxido de carbono.

• **Coliformes termotolerantes**: realizou-se as etapas de coliformes totais até a prova presuntiva, se houvesse formação de gás carbônico dentro do tubo Duran, realizou-se a prova confirmativa, na qual o volume do tudo foi inoculado em caldo EC e fez-se a incubação a 45 °C por 24 h a 48 h. Através de tabela específica, chegou-se ao valor do Número Mais Provável (NMP) por grama.

• ***Bacillus cereus***: foram preparadas diluições decimais seriadas das amostras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), com semeadura em placas de Petri contendo ágar vermelho de fenol-gema de ovo-manitol-polimixina B (Ágar MYP ou meio de Mossel). Após a incubação a 30 °C por 24 horas realizou-se a contagem de exemplares típicos de *B. cereus*. As contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia por cm^2 (UFC/ cm^2).

• ***Staphylococcus aureus***: foram pipetados assépticamente 25 mL das amostras e transferidos para 225 mL de água peptonada (diluição 10^{-1}). A partir dessa, procedeu-se uma série de diluições em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina

estéril. Pipetou-se alíquotas de 0,1 mL dos tubos diluídos e com o auxílio de alça espalhou-se o volume em placa de Petri contendo ágar sangue. A seguir as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

• **Bolores e leveduras:** semeou-se em profundidade 1 mL de cada diluição decimal seriada, em duplicata, utilizando como meio o ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10% até pH 3,5. A incubação deu-se a 25°C, por cinco dias, para realização da contagem de bolores e leveduras.

• **Bactérias Mesófilas:** foi pipetado 25 mL da amostra e adicionado 225 mL de solução salina peptonada 0,1 %. Esta é a diluição 10^{-1} . A partir desta diluição inicial, a diluição 10^{-2} foi feita retirando-se 1 mL da diluição 10^{-1} para 9 mL de solução diluente; do mesmo modo foi feita a diluição 10^{-3} . Semeou-se em placas de Petri estéreis, 1 mL de cada uma das diluições e em seguida foi adicionado cerca de 15 de PCA fundido. Em seguida, homogeneizou-se o ágar, utilizando uma alça de Drigalsky, com o inóculo. Deixou-se solidificar em superfície plana. A incubação foi feita com as placas invertidas, em temperatura de 35 °C por 48 horas.

5.2.6- Análise sensorial

A análise sensorial foi conduzida após a aprovação do projeto (número do processo: 16166713.6.0000.5411) pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” da cidade de Botucatu/SP. O qual solicitou que os provadores assinassem o “Termo de consentimento livre e esclarecido”, indicando que estavam concordando em participar do teste (Anexo 1).

Somente houve análise sensorial quando a contagem microbiológica nas amostras ficou entre 0 e o limite estabelecido pela legislação (RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001) vigente (BRASIL, 2001b). Além disso, se qualquer tratamento do EHS, ou do suco de uva, ou da bebida mista no decorrer da vida de prateleira apresentasse nota igual ou menor que 4 (desgostei ligeiramente) para qualquer atributo avaliado, o mesmo seria eliminado do experimento. E no caso da bebida mista, o

tratamento também seria interrompido antes dos meses estabelecidos (9 meses), sendo caracterizado como produto não adequado para o consumo.

A análise sensorial das bebidas foi realizada no horário de intervalo dos alunos (período da manhã: 9:30-10:00h ou período da tarde: 15:00-16:00h) sob luz branca, amostras codificadas com números de três dígitos e aleatorizadas.

A análise foi conduzida pelo método afetivo e o teste aplicado foi o da aceitação – realizado através da escala hedônica e da escala da intensidade. As notas das escalas foram utilizadas para avaliar os atributos de cada amostra. No experimento 2 os atributos avaliados foram: aparência, sabor, aroma, consistência, acidez e avaliação global (Anexo 2). Como os provadores aprovaram (com notas acima de 4-desgostei ligeiramente) o atributo consistência e acidez do EHS. A partir do experimento 3 e 4 foram avaliados apenas os atributos aparência, sabor, aroma e avaliação global (Anexo 3).

A escala hedônica estruturada de nove pontos foi representada pelas seguintes notas: 1-desgostei muitíssimo, 2-desgostei muito, 3-desgostei regularmente, 4- desgostei ligeiramente, 5-indiferente, 6-gostei ligeiramente, 7-gostei regularmente, 8-gostei muito e 9-gostei muitíssimo. Já a escala da intensidade variou do muito mais intenso do que gosto (2), um pouco mais intenso do que gosto (1), intenso da maneira que gosto (0), um pouco menos intenso do que gosto (-1) ao muito menos intenso do que gosto (-2).

Foram recrutados 60 provadores não selecionados e não treinados (CHAVES; SPROESSER, 1999). Entre os provadores estavam os funcionários e alunos dos cursos de graduação e pós-graduação do Campus da UNESP de Botucatu. Para cada provador serviu-se 30 mL da bebida refrigerada (± 4 °C) em copos transparentes de plástico (ABNT, 1998; BRASIL, 2005a).

No experimento 2 foram avaliados os seguintes atributos: aparência, aroma, sabor, doçura, acidez, consistência e avaliação global. Já nos experimentos 3 e 4 foram avaliados somente os atributos aparência, aroma, sabor e avaliação global.

Análise sensorial do Experimento 2 e 3 (etapa 1 e 2) foi realizada em março de 2014, em diferentes dias.

As análises sensoriais do experimento 4 foram realizadas no decorrer dos meses da vida de prateleira da bebida mista. Sendo a primeira análise sensorial realizada em abril, a segunda em maio, a terceira em junho. Em função da

ausência de microrganismos, as análises sensoriais passaram a ser realizadas bimestralmente, sendo a próxima executada em agosto, depois em outubro e finalmente em dezembro.

5.2.7- Vida de prateleira

O teste de vida de prateleira foi aplicado ao experimento 4 (Bebida mista de EHS e suco de uva), realizado por 9 meses. Os produtos que apresentaram contaminação microbiológica foram descartados no devido mês, não sendo realizada a análise sensorial dos mesmos.

No teste de vida de prateleira foram realizadas para as amostras avaliadas as análises microbiológicas, sensoriais (com 60 provadores) e químicas (citadas acima). O teste apenas foi interrompido se uma ou mais das análises microbiológicas apresentassem contagem acima do limite legal, ou se um dos atributos sensoriais ficasse com nota igual ou inferior a 4 para alguma das amostras, nesse caso, independente se a contagem microbiológica estivesse dentro do padrão exigido pela ANVISA (BRASIL, 2001b).

Dois lotes (maio e junho) seguidos das amostras mantidas em temperatura ambiente apresentaram-se deteriorados, motivo que impediu a continuidade da vida de prateleira dos produtos condicionados em temperatura ambiente. Já as amostras armazenadas sob refrigeração demonstraram-se adequadas para o consumo em três meses consecutivos. A condição de estabilidade microbiológica das amostras refrigeradas permitiu que as análises sensoriais deixassem de ser realizadas mensalmente para bimestralmente. Portanto as análises sensoriais foram realizadas na seguinte sequência: Abril-mês inicial (análise sensorial da bebida foi conduzida depois de cinco dias dela produzida, pois esse é o tempo necessário para realizar a análise microbiológica das amostras); Maio-mês 2 (análise sensorial realizada depois de 1 mês e 5 dias), Junho-mês 3 (análise sensorial realizada depois de 2 meses e 5 dias); Agosto- mês 5 (análise sensorial realizada depois de 4 meses e 5 dias); Outubro-mês 7 (análise sensorial realizada depois de 6 meses e 5 dias); Dezembro- mês 9 (análise sensorial realizada depois de 8 meses e 5 dias da bebida produzida).

5.2.8- Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas e sensorial foram expressos através de médias e desvio padrão. No experimento 1 utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparar as análises bioquímicas entre os tratamentos, visto que os valores não atenderam à suposição de normalidade. Para as análises físico-químicas e bioquímicas do experimento 2 utilizou-se o teste T, quando compararam-se dois tratamentos- extração quente x fria, e a análise de comparação múltipla de Dunett, quando comparou-se o controle com os demais tratamentos (comparação dos aditivos).

Ao experimento 3 (etapas 1 e 2) e 4 utilizou-se a análise de variância para verificar o efeito de tratamento e quando houve diferença significativa, realizaram-se as comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni com o objetivo de comparar todos os tratamentos entre si. Este teste é adequado pois considera uma correção pelo número de comparações necessárias.

No experimento 4, também aplicou-se o teste T, ao comparar dois tratamentos. Na análise sensorial utilizou-se a análise estatística descritiva pelo teste de Wilcoxon (experimento 2- comparação de duas amostras) e Friedmann (experimento 3 e 4- comparação de mais de duas amostras) pois trata-se de variáveis qualitativas ordinais e há dependência entre as amostras. No caso em que a suposição de normalidade não foi atendida utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis na comparação entre populações independentes (PAGANO; GAUVREAU, 2004; VIEIRA, 2006).

6-RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Experimento 1

Nessa etapa do trabalho foram realizadas as análises bioquímicas em três cultivares de soja, submetidos a diferentes doses de radiação gama, com o objetivo de se avaliar possíveis alterações dos componentes fenólicos e seu potencial antioxidante (Figura 8), bem como de algumas enzimas oxidativas e antioxidativa (Figura 9) decorrentes da submissão dos grãos de soja a radiação gama. Além de caracterizar as diferenças bioquímicas entre os três cultivares de soja e selecionar apenas um cultivar para o próximo experimento.

a) Análise Bioquímica

Os resultados obtidos mostraram que o aumento da dose de radiação gama não interferiu significativamente nos teores de flavonóides e na capacidade antioxidante dos cultivares de soja, logo os resultados não diferiram significativamente entre os tratamentos e entre os três cultivares (Figura 8).

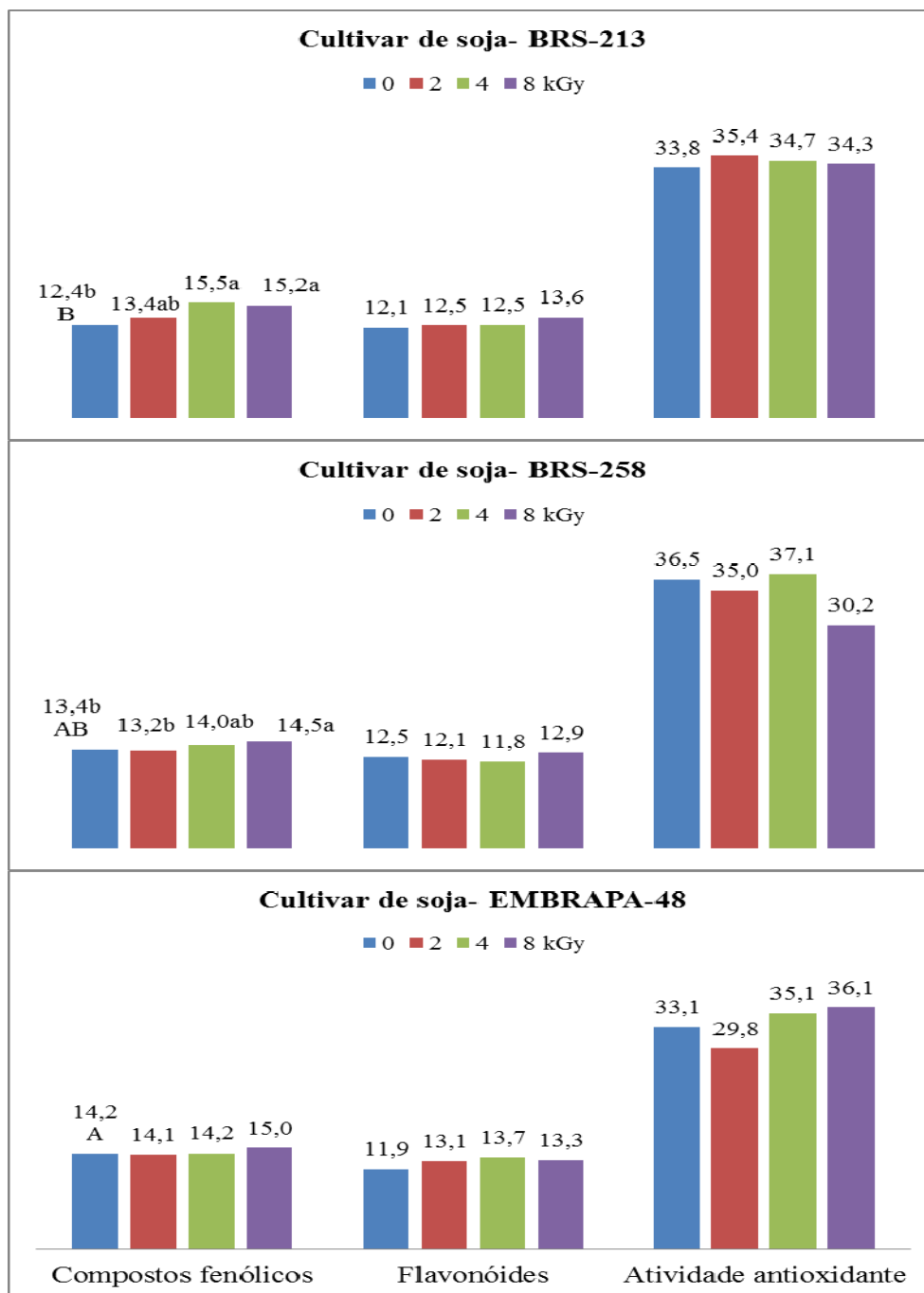


Figura 8. Resultados médios dos compostos fenólicos (mg de fenois g⁻¹ b.s.), flavonóides (mg de fenois g⁻¹ b.s.) e atividade antioxidante (μm 100g⁻¹ b.s.) de cada cultivar de soja (BRS-213, BRS-258, EMBRAPA-48) submetido a diferentes doses de radiação gama (2, 4 e 8 kGy), sendo 0 a ausência de radiação (controle). Letras minúsculas comparam as diferenças entre as doses (horizontal) de cada determinação, letras maiúsculas, na vertical, comparam as diferenças entre as cultivares para cada dose recebida a partir do teste de Kruskal-Wallis.

O teor de compostos fenólicos diferiu somente entre as cultivares de soja para o tratamento controle (Figura 8), demonstrando que alguns parâmetros podem variar entre os inúmeros cultivares de soja ofertados no mercado, fato que pode ser justificado pelas diferenças edafo-climáticas, características do solo, variações genotípicas, entre outras (KUMAR *et al.*, 2010). Além disso, no cultivar BRS-213 e BRS-258 houve aumento dos compostos fenólicos em função da dose de radiação, principalmente a partir de 4 kGy, a qual diferiu estatisticamente do tratamento 2 kGy e do controle. Essa condição pode estar associada aos radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo em detrimento ao método de conservação, estimulando o metabolismo secundário do vegetal, especificamente a enzima fenilalanina amonioliase a catalisar mais compostos antioxidantes (fenóis) (BHAT; SRIDHAR; TOMITA-YOKOTANI, 2007).

Toledo *et al.* (2007a) observaram aumento significativo dos compostos fenólicos do cultivar BRS-213, ao comparar o controle (8,07 mg g⁻¹) com os grãos de soja que foram submetidos a dose de 8 kGy de radiação gama (10,83 mg g⁻¹), resultados médios que ficaram aquém ao encontrado para mesma cultivar deste experimento, contendo para o controle 12,4 mg g⁻¹ e para os grãos submetidos a 8 kGy 15,2 mg g⁻¹ (Figura 8). Entretanto, a porcentagem de aumento dos compostos fenólicos para Toledo *et al.* (2007a) foi maior (34 %) ao encontrado nesse estudo (23 %). Contudo, os mesmos autores ressaltaram que a dose de 8 kGy possivelmente modificou a estrutura da molécula dos compostos fenólicos insolúveis para solúveis ou rompendo a parede celular, favorecendo a detecção do composto.

Os resultados demonstraram que grande porcentagem dos compostos fenólicos presentes nos grãos de soja são representados pelos flavonóides, sendo que a média entre os tratamentos foi de 89,83 %, 89,44 % e 90,40 % de flavonóides para os cultivares BRS-213, BRS-258 e Embrapa 48, respectivamente (Figura 8). Resultados que concordam aos encontrados por López-Gutiérrez *et al.* (2014) que ao analisarem produtos a base de soja detectaram média 93 % de isoflavonas (flavonóides) dentre os compostos fenólicos. Essas elevadas porcentagens de flavonóides já eram esperadas, uma vez que diversos relatos na literatura destacam os elevados teores de isoflavonas presentes nos grãos de soja (BARBOSA *et al.*, 2006; VERARDO *et al.* 2015).

Os cultivares de soja BRS-213, BRS-258 e Embrapa- 48, quando comparados ao controle, apresentaram maior aumento da capacidade antioxidante ao serem submetidos às doses de 2 kGy (4,73 %), 4 kGy (1,64 %) e 8 kGy (9,06 %),

respectivamente (Figura 8). Embora esse aumento da capacidade antioxidante não seja significativo, tais resultados concordam com Dixit *et al.* (2010) que afirmaram que a radiação induziu o aumento crescente da capacidade antioxidante de três cultivares de soja ao irradiá-los na dose de 0,5 e 2 kGy, ocorrendo redução da mesma na dose de 5 kGy. Da mesma maneira Popovic *et al.* (2013) obtiveram aumento gradativo da capacidade antioxidante ao submeter o cultivar de soja sérvio as doses de 1, 2, 4 e 10 kGy de radiação gama.

Elevar a dose de radiação gama não interferiu em mudanças significativas das enzimas analisadas (SOD, PPO e POD) nos três cultivares de soja (BRS-213, BRS-258 e EMBRAPA-48), com exceção da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) do cultivar de soja BRS-213, a qual apresentou diferença significativa da atividade quando elevou-se a dose de radiação gama de 2 e 4 kGy para 8kGy (Figura 9). Ao comparar com o controle, notou-se que houve aumento da porcentagem da atividade da SOD de 1 % na dose de 2 kGy e de 16 % na dose de 4 kGy, entretanto, na dose de 8 kGy reduziu 5 % a atividade da SOD. Essa inibição da SOD na dose de 8 kGy está provavelmente associada a desnaturação da estrutura da enzima pelo tempo de exposição aos raios gama (DIXIT *et al.*, 2012).

Tewari *et al.* (2014) analisaram as enzimas antioxidativas (SOD, CAT e POD) e não encontraram diferenças significativas ao elevar as doses de radiação (0,25; 0,5 e 1 kGy) em quatro cultivares de soja (BR-2, BS-1, Pk-416 e Bragg) condição que se assemelha aos resultados encontrados para SOD (cultivar BRS-258 e EMBRAPA-48) e POD em todas as cultivares desse estudo, demonstrando que tais enzimas são estáveis nestas cultivares de soja quando expostas até 8 kGy de radiação gama (Figura 9). Porém, Alikamanoglu *et al.* (2011), ao elevarem as doses de radiação gama 0,1; 0,2; 0,3, 0,4 e 0,5 kGy obtiveram redução na atividade da SOD e da POD em um cultivar de soja da Turquia. Caracterizando que as enzimas de cada cultivar de soja podem reagir de maneira diferente à radiação gama.

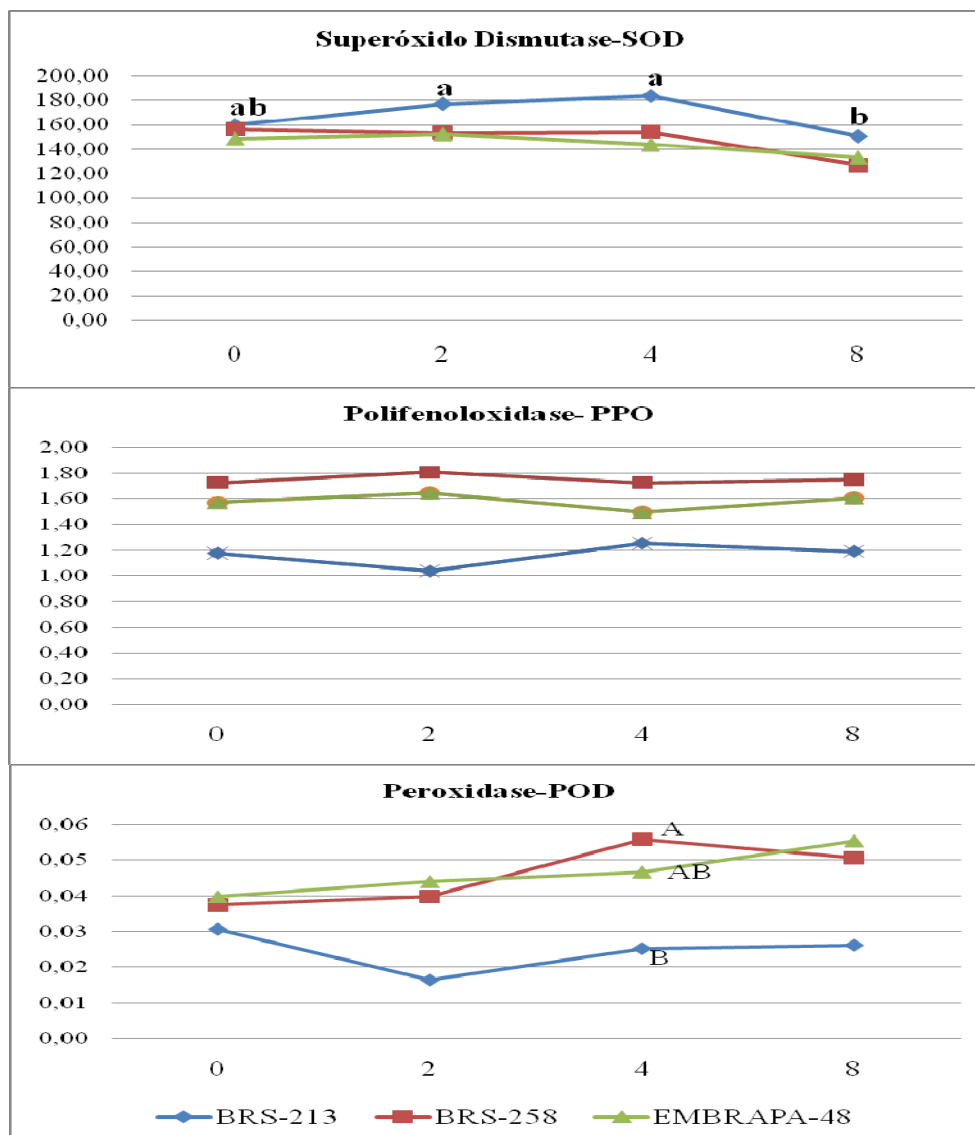


Figura 9. Atividade das enzimas SOD (Usod μ proteína⁻¹), PPO (μ mol de catecol mg de amostra⁻¹), e POD (μ mol de H_2O_2 mg^{-1} de proteína) dos cultivares de soja BRS-213, BRS-258 e EMBRAPA-48 submetidos a doses de 2, 4 e 8 kGy, sendo 0 controle. Letras minúsculas na horizontal comparam as diferenças entre as doses de radiação para cada cultivar de soja. Letras maiúsculas na vertical comparam as diferenças entre os cultivares para cada dose recebida a partir do teste de Kruskal-Wallis.

A necessidade de quantificar a peroxidase e polifenoloxidase se dá pelo seu reconhecido impacto na indústria de alimentos. Essas enzimas são oxireduases capazes de catalizar reações oxidativas nos vegetais, sendo a peroxidase responsável por induzir mudanças de sabor durante a estocagem e a polifenoloxidase conferir mudanças de cor no alimento (FREITAS *et al.*, 2008). Dessa forma, o fato do aumento da dose não interferir significativamente na atividade dessas enzimas caracteriza esse método de

conservação como vantajoso, por não aumentar a atividade de ambas as enzimas (Figura 9).

Somente houve diferença significativa entre as cultivares de soja para atividade da peroxidase na dose de 4 kGy de radiação gama, ao comparar a atividade das demais enzimas entre os cultivares de soja para cada dose de radiação notou-se resultados médios semelhantes, não havendo diferença entre as mesmas (Figura 9).

Como os resultados das análises bioquímicas mantiveram-se semelhantes entre as cultivares de soja e não diferiram em função da elevação das doses de radiação gama, selecionou-se o cultivar BRS-213 para se produzir o EHS dos demais experimentos. Além disso, o mesmo é livre de lipoxigenases, isoenzimas presentes nos vegetais capazes de catalisar reações sobre os ácidos graxos poliinsaturados e gerar compostos desagradáveis ao paladar e aroma (AXELROD; CHEESBROUGH; LAAKSO, 1981).

6.2- Experimento 2

No experimento 2 analisou-se os EHS produzidos pelos métodos de extração a quente e a frio, cujo objetivo foi identificar o melhor método de produção de EHS a partir dos resultados obtidos das análises físico química, de cor, bioquímica, microbiológica e sensorial, demonstrados nas figuras 10, 11, 12, 13 e 14 e tabelas 3 e 4. Dessa maneira foi possível selecionar o método de produção do EHS, o qual foi utilizado nos próximos experimentos.

a) Análise físico-química

Os macronutrientes (proteína, lipídios e carboidratos) diferiram significativamente entre os métodos de extração quente e frio (Figura 10), demonstrando que apesar de utilizar a mesma proporção soja : água (1:6) e o mesmo cultivar de soja (BRS-213) em ambos os processamentos a porcentagem da composição centesimal foi diferente entre os EHS, ou seja, tais características dependem do método utilizado na produção da bebida (GIRI; MANGARAJ, 2012).

Nos parâmetros que apresentaram diferença significativa entre os tratamentos observaram-se maiores porcentagem dos resultados para o EHS produzido

pelo método de extração a frio, demonstrando ser uma bebida mais rica nutricionalmente quando comparada aos resultados obtidos pelo EHS produzido pelo método extração a quente. Dessa forma, como a caloria (energia metabolizável) foi calculada a partir dos macronutrientes, a mesma foi maior para o EHS de extração a frio (Figura 10).

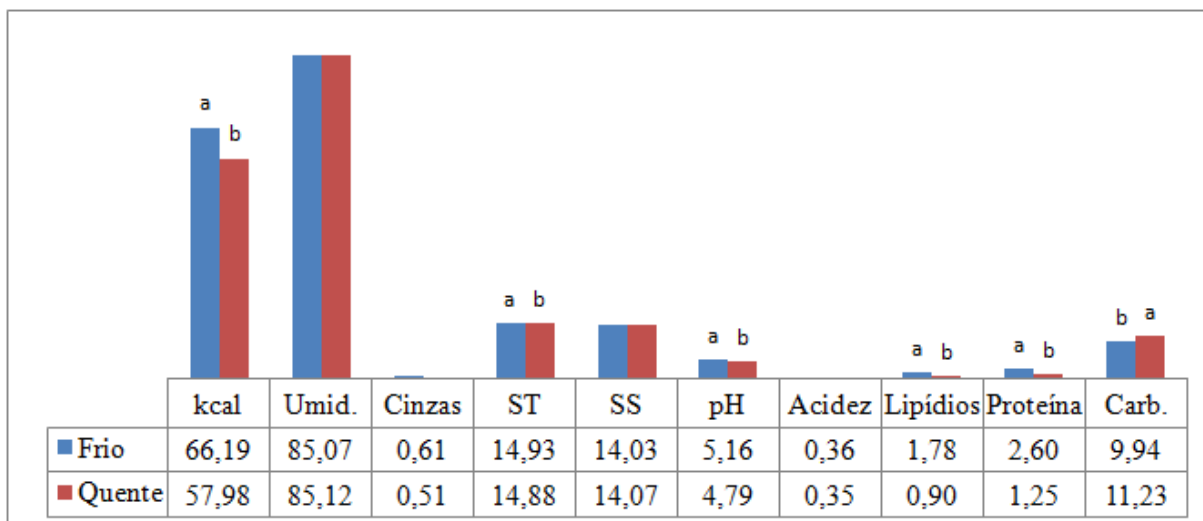


Figura 10. Resultados médios (n=3) da composição físico-química de EHS produzido pelo método de extração a frio (■) e a quente (■). Umid.:Umidade (%); ST: Sólidos Totais (%); SS.:Sólidos Solúveis (°Brix); Carb.: carboidratos (%). Cinzas (%), Lipídios (%), proteína (%) e pH (g de ácido cítrico 100 mL⁻¹). Letras minúsculas diferentes entre os tratamentos indicam diferença a partir do teste T.

Somente os carboidratos do EHS produzido pelo método de extração a frio (9,94 %) ficaram aquém ao encontrado para o EHS produzido pelo método de extração a quente (11,23 %), sendo representado principalmente pelos açúcares do suco concentrado de maçã, adicionado às bebidas para adoçá-las, pois o EHS apresenta traços de oligossacarídeos não metabolizáveis como rafinose (0,012 %) e estaquiose (0,064 %), contendo apenas 0,12 % de sacarose e 1,5 % de outros carboidratos como galactose, glicose, frutose, verbascose (RODRIGUES; MORETTI, 2008). Dessa maneira, como os EHS foram padronizados a 14 °Brix de sólidos solúveis, a partir do cálculo do balanço de massas notou-se que foi necessário adicionar maior quantidade de suco concentrado de maçã para o EHS produzido pelo método de extração a quente, por ser mais pobre em nutrientes, ou seja, continha o teor de sólidos solúveis menor ao do EHS produzido pelo método de extração a frio, justificando os diferentes resultados de carboidratos entre os tratamentos (Figura 10).

A análise de cor indicou a partir do índice a^* e b^* , que independente do método de produção do EHS, as amostras apresentaram cores amarelas esverdeadas (Figura 11), embora a contribuição do verde seja ínfima de acordo com os resultados bem próximos ao zero, demonstrando que as bebidas possuem cor amarelada, o mesmo foi comprovado pelo valor do $^\circ\text{Hue}$ (aproximadamente 90°) que indica a cor amarela para as amostras. Tais resultados foram decorrentes da cor característica da maioria dos cultivares de soja e do suco concentrado de maçã (Figura 1) que foi adicionado aos EHS.

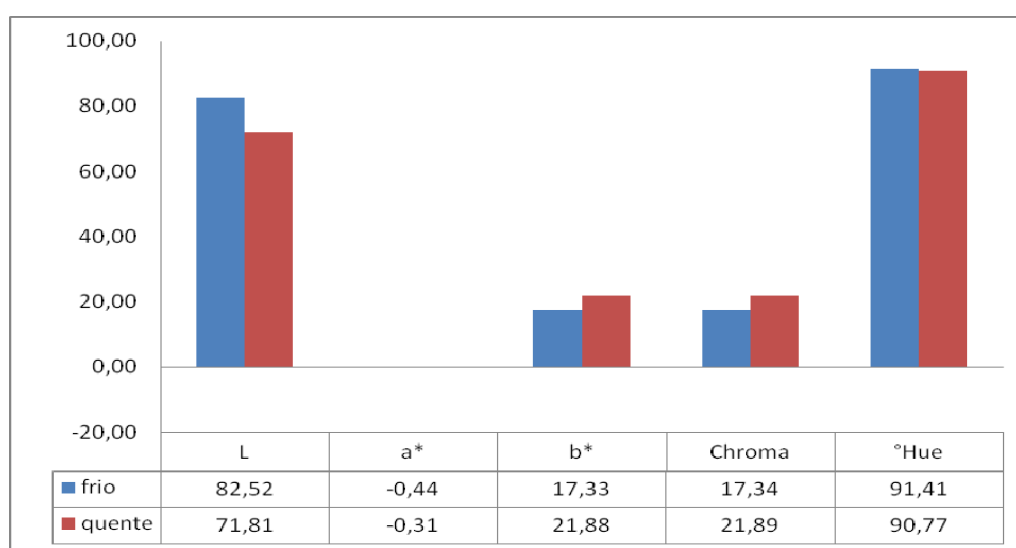


Figura 11. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a^* , intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b^* , saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática ($^\circ\text{Hue}$) de EHS produzido com o cultivar BRS-213 pelo método de extração a frio (■) e a quente (■). Ausência de letras diferentes indicam que não houve diferença significativa a partir do teste T.

O EHS produzido pelo método de extração a frio apresentou maior resultado de luminosidade, demonstrando que o mesmo é mais claro que o EHS extraído pelo método de extração a quente, da mesma forma, esse resultado se confirma com o índice Chroma menor para o EHS extraído pelo método a frio, indicando que o mesmo é menos saturado, ou seja, possui coloração mais clara que o EHS do outro método (Figura 11).

O $^\circ\text{Hue}$ não diferiu significativamente entre ambos os tratamentos, demonstrando que não houve diferença entre as tonalidades dos EHS. O provável motivo do EHS extraído pelo método de extração a quente ter ficado com maior saturação (índice

Chroma) foi por conter maior quantidade do suco concentrado de maçã, o qual apresenta coloração escura, com aspecto de açúcar caramelizado (Figura 1).

O EHS produzido pelo método de extração a frio apresentou maior teor de proteína e lipídios quando comparado ao outro método (Figura 10), tais substâncias conferem turbidez a bebida e consequente interferência na cor, entretanto suas porcentagens não foram tão relevantes quanto à cor proveniente do suco de maçã clarificado dado à diferença dos resultados para a luminosidade e o índice Chroma entre os tratamentos (Figura 11). Nunes *et al.* (2014) analisaram bebida comercial de soja sabor iogurte com polpa de morango e encontraram valores menores para a luminosidade ($L=65$) aos obtidos nesse experimento (Figura 11), pois ao adicionar a polpa de morango tornou a bebida mais escura, outro fator importante é a proporção soja: água da bebida, o que a torna mais ou menos diluída, condição que também interfere na cor do produto.

b) Análises bioquímicas

A realização das análises bioquímicas foram para observar as possíveis contribuições aos resultados a partir do uso dos aditivos para suplementar os EHS produzidos pelos dois métodos (extração a frio e a quente). Os resultados (Figura 12, 13 e 14) comprovaram que alguns dos aditivos utilizados foram responsáveis pelo aumento dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante do EHS.

Dentre os aditivos utilizados esperava-se que o tocoferol e o açúcar do suco concentrado de maçã pudessem contribuir para o aumento dos compostos fenólicos. Esta expectativa baseava-se em que o tocoferol sendo composto monofenólico e o suco concentrado de maçã em conter os polifenóis como procianidina B2, catequinas e epicatequinas, quercetinas e feredzinas (WILL *et al.*, 2000). Entretanto, ambos os compostos utilizados como aditivos não influenciaram no teor dos compostos fenólicos em relação ao EHS puro (Figura 12).

Ao comparar os compostos fenólicos do EHS puro (método a frio) com os EHS suplementos por cada aditivo, notou-se que houve diferença apenas quando foi adicionado ácido ascórbico, estabilizante e quando se adicionou todos os aditivos. Esperava-se que a mistura de aditivos pudesse contribuir para o aumento do teor dos compostos fenólicos em relação aos demais tratamentos. Porém, na realidade esta prática não apresentou efeito de forma sinérgica, pois quando se observou os demais aditivos de

forma isolada, verificou-se que o ácido ascórbico apresentou o teor de compostos fenólicos similar ao tratamento onde aplicou-se todos os aditivos, sendo o ácido ascórbico o principal responsável pelo aumento do teor dos fenólicos no EHS (Figura 12). Já o estabilizante goma acácia/arábica adicionado ao EHS não contribuiu para o aumento dos compostos fenólicos por ser constituído de polissacarídeos e glicoproteínas, considerada fibra solúvel (ACEDO-CARRILLO *et al.*, 2006). Ao contrário, seu uso resultou em diminuição dos compostos fenólicos presentes no EHS quando comparado ao extrato puro, provavelmente pela ação diluente do estabilizante adicionado (4%) ao volume de EHS (Figura 12).

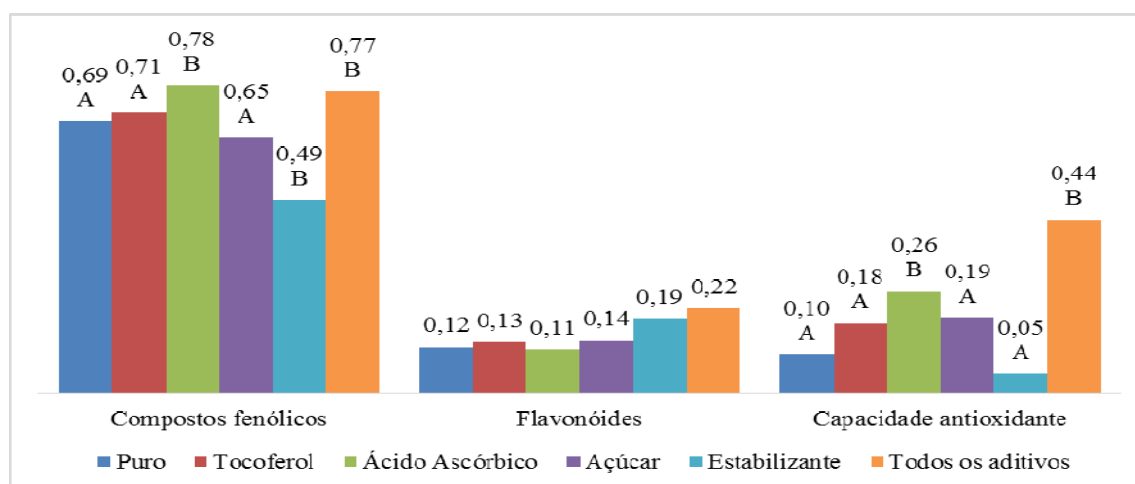


Figura 12. Comparação dos valores médios do EHS puro (método de extração a frio) com o EHS suplementado com aditivos (tocoferol; ácido ascórbico; açúcar do suco concentrado de maçã; estabilizantes- goma acácia e liga neutra; e todos os aditivos juntos) para cada componente bioquímico (compostos fenólicos- mg mL⁻¹; flavonóides- mg mL⁻¹; e capacidade antioxidante- μmol mL⁻¹ amostra). Letras maiúsculas distintas demonstram diferença das amostras suplementadas com a amostra controle (Puro) pela análise de comparação múltipla de Dunett.

A maior concentração dos compostos fenólicos no tratamento com ácido ascórbico pode ser discutida em função da sua reatividade com os reagentes presentes nas análises de quantificação dos fenóis. O EHS puro de fato contém apenas traços de ácido ascórbico (EMBRAPA, 2003; RODRIGUES; MORETTI, 2008), porém adicioná-lo ao EHS também contribuiu para reduzir o folin ciocalteu (componente da análise de fenóis), em meio básico formando o composto azul de molibdênio (GENOVESE *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2005). Assim, conclui-se que a depender da presença de ácido

ascórbico em misturas de bebidas, pode haver incremento dos resultados dos compostos fenólicos (Figura 12).

Não houve diferença significativa do teor de flavonóides do EHS puro em relação aos EHS suplementados com os aditivos. Entretanto, a capacidade antioxidante do EHS puro foi diferente do EHS com ácido ascórbico e do EHS com a adição de todos os aditivos. O ácido ascórbico, conhecido pelo seu grande potencial antioxidante (CERQUEIRA *et al.*, 2007) possui atividade correlata ao tocoferol. Entretanto, o EHS suplementado com tocoferol não diferiu do EHS puro em relação a capacidade antioxidante (Figura 12).

O EHS puro, produzido pelo método de extração a quente, apresentou o teor dos compostos fenólicos diferente do EHS suplementado com ácido ascórbico e com todos os aditivos. A adição de açúcar (suco concentrado de maçã) ao EHS contribuiu com aumento de 22 % dos compostos fenólicos, justificado pela porcentagem de polifenóis, presentes naturalmente no suco. Entretanto, mesmo o suco aumentando a porcentagem dos compostos fenólicos, essa contribuição não foi estatisticamente significativa, quando comparado com o EHS puro (Figura 13). Porém, a capacidade antioxidante pode ser atribuída pela presença dos polifenóis do suco concentrado de maçã, demonstrada pelo aumento de 240 % quando comparada ao resultado obtido para o EHS puro. A adição do ácido ascórbico ao EHS elevou sua capacidade antioxidante em 820 %, indicando que o mesmo possui maior potencial antioxidante comparado aos outros aditivos, inclusive igualando-se a capacidade antioxidante quando se utilizou os aditivos em consórcio (Figura 13).

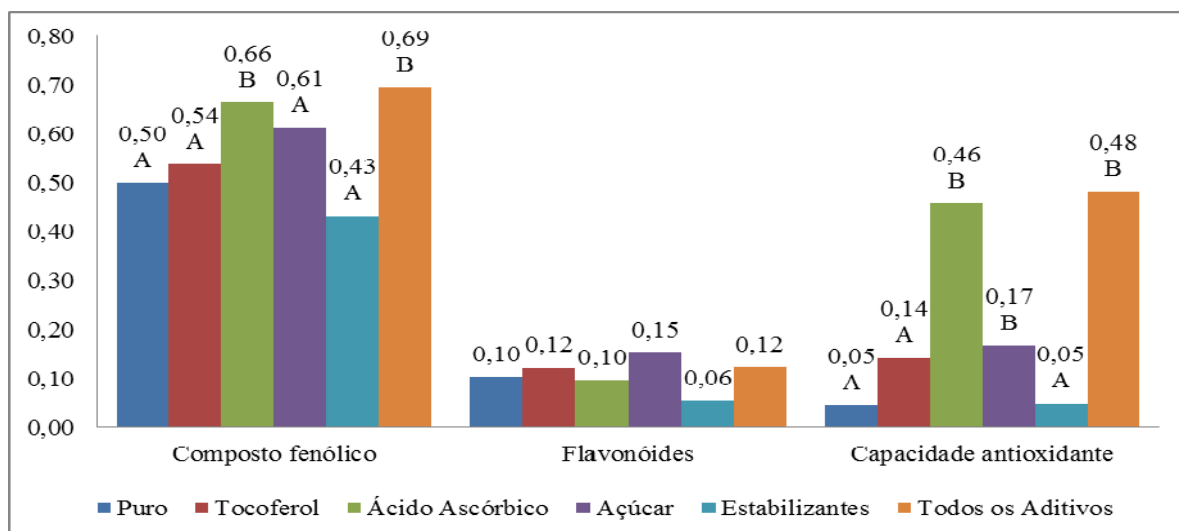


Figura 13. Comparação dos valores médios do EHS puro (método de extração a quente) com o EHS suplementado (tocoferol; ácido ascórbico; açúcar do suco concentrado de maçã; estabilizantes- goma acácia e liga neutra; e todos os aditivos juntos) para cada componente bioquímico (compostos fenólicos- mg mL^{-1} ; flavonóides- mg mL^{-1} ; e capacidade antioxidante- $\mu\text{mol mL}^{-1}$ amostra). Letras maiúsculas distintas demonstram diferença das amostras suplementadas com a amostra controle (Puro) pela análise de comparação múltipla de Dunett.

O EHS produzido pelo método de extração a frio apresentou maior teor de compostos fenólicos, para todas as variáveis, quando comparado ao EHS produzido pelo método de extração a quente. Porém, o EHS puro diferiu significativamente do EHS com adição de ácido ascórbico, com estabilizante e com todos os aditivos juntos. O método de extração a frio permitiu que o EHS concentrasse mais sólidos solúveis e consequentemente apresentou mais compostos fenólicos (Figura 14).

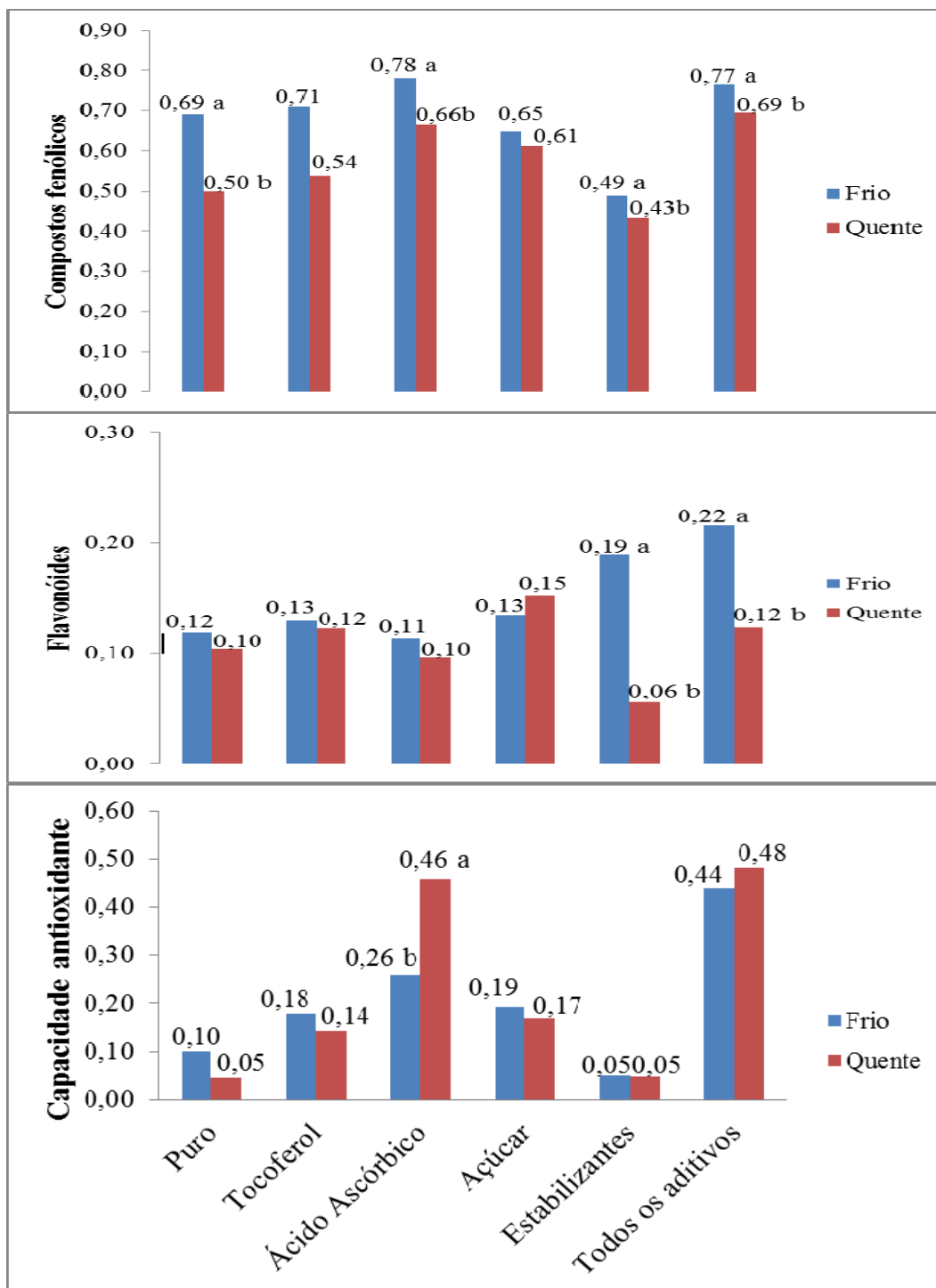


Figura 14. Comparação entre os valores médios do EHS extraídos pelo método a frio (■) e a quente (■) e com cada aditivo utilizado para suplementá-lo (tocoferol; ácido ascórbico; açúcar do suco concentrado de maçã; estabilizantes- goma acácia e liga neutra; e todos os aditivos juntos) para os componentes bioquímicos: compostos fenólicos- mg mL⁻¹; flavonóides- mg mL⁻¹; e capacidade antioxidante- μmol mL⁻¹ amostra. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa a partir do teste T.

O teor de flavonóides foi semelhante para a maioria dos tratamentos com aditivos, independentemente do métodos de extração do EHS (Figura 14). Na soja, os flavonoides predominantes são as isoflavonas. Zhang *et al.*, (2015) ao quantificá-las observaram que o método de trituração a quente foi mais eficiente que o método de trituração a frio. Tal resultado foi diferente ao encontrados no presente experimento, pois os teores de flavonóides não diferiram significativamente entre os métodos de extração para o EHS puro.

Mesmo o EHS-extração a frio apresentando maiores teores de compostos fenólicos que o EHS-extração a quente, tais porcentagens não foram suficientes para diferir a capacidade antioxidante em ambos os métodos de extração para a maioria dos tratamentos (Figura 14). Somente a adição de ácido ascórbico induziu aumento da capacidade antioxidante entre os métodos, entretanto a quantidade adicionada foi igual para os EHS (extração quente e fria). O maior potencial antioxidante ficou para o EHS (extração a quente) com ácido ascórbico, possivelmente por conter menos sólidos totais, em especial carboidratos e proteínas que são considerados fatores interferentes na análise (NASSER *et al.*, 2011).

c) Análise microbiológica

O EHS produzido pelo método de extração a quente e o EHS produzido pelo método de extração a frio apresentaram ausência de microrganismos. Este resultado indica que o número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes foi menor que três por mL de amostra e que não cresceu nenhuma colônia de bactéria, bolor e levedura, ou seja, houve ausência de unidade formadora de colônia-UFC (Tabela 3). Além disso, tais resultados demonstraram que ambos os métodos de produção foram eficientes para eliminar possíveis microrganismos provindos da matéria-prima (soja), da água, dos utensílios usados no processamento, do ambiente e/ou da manipulação.

Os EHS tiveram a adição de ácido ascórbico e suco concentrado de maçã que contem ácidos fenólicos, responsáveis por reduzir o pH dos EHS. Dessa forma, os resultados de pH foram inferiores (pH: 5,16 para EHS-extração a frio e pH: 4,79 para o EHS-extração a quente) ao encontrado na literatura (pH: 7,0) (ABREU *et al.*, 2007; RODRIGUES; MORETTI, 2008). Porém, mesmo com essa redução de pH, a quantidade de ácidos orgânicos presentes na amostra não apresentou potencial para eliminar os

microrganismo, pois para isso seria necessário atingir pH abaixo de 4,0, o qual impede crescimento de microrganismos decompositores (FORSYTHE, 2002). Assim sendo, a ausência da carga microbiana (Tabela 3) pode ser creditada aos métodos de processamento da soja.

Tabela 3. Resultado da contagem microbiológica do EHS produzido pelo método de extração a quente e a frio.

| Microrganismos | EHS | |
|--|------|--------|
| | Frio | Quente |
| <i>Salmonella SP</i> (*UFC) | <10 | <10 |
| Coliformes totais (**NMP mL ⁻¹) | <10 | <10 |
| Coliformes termotolerantes (NMP mL ⁻¹) | <10 | <10 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC) | <10 | <10 |
| Bolores e leveduras (UFC) | <10 | <10 |
| <i>Bacillus cereus</i> (UFC) | <10 | <10 |
| Bactérias mesófilas (UFC) | <10 | <10 |

*UFC: unidade formadora de colônia; ** NMP mL⁻¹: número mais provável por mililitro.

d) Análise sensorial

As notas maiores do teste da escala hedônica foram mais frequentes em todos os atributos avaliados para o EHS - extração a quente, demonstrando que esse obteve melhor aceitação que o EHS- extração a frio. Entretanto, Ciabotti *et al.* (2007) ao utilizar o cultivar BRS-213 para produzir o EHS pelo método de extração a frio obteve bons resultados médios para o atributo sabor (7,61), indicando que os provadores gostaram regularmente a muito do EHS. Entretanto, nesse trabalho, o resultado médio para o atributo sabor foi de 3,9 para o EHS-extração a frio (provadores desgostaram regularmente a ligeiramente). A maneira mais indicada para demonstrar os resultados das características qualitativas (aparência, aroma, sabor, doçura, consistência, acidez e avaliação global) é utilizando o valor mediano (PAGANO; GAUVREAU, 2004; VIEIRA, 2006). Ainda assim, Ciabotti *et al.* (2007), apresentaram estes atributos em resultados médios das notas da escala hedônica, os quais são sugeridos para expressar características quantitativas e não qualitativas.

Tabela 4. Mediana das notas dos atributos do EHS produzido pelo método de extração a quente e a frio.

| Atributos | EHS | | | |
|------------------|-----------------|------|-----------------------|------|
| | Escala Hedônica | | Escala da Intensidade | |
| | Quente | Frio | Quente | Frio |
| Aparência | 7 a | 6 b | 0 a | 1 a |
| Aroma | 6 a | 5 b | 0 a | 1 a |
| Sabor | 6 a | 4 b | 0 a | -1 a |
| Doçura | 5 a | 4 b | -1 a | -1 a |
| Acidez | 5 a | 5 b | 0 a | 0 b |
| Consistência | 6 a | 5 b | 0 a | 0 b |
| Avaliação global | 6 a | 5 b | 0 a | -1 a |

* Considera-se um nível de significância de 0,05 pelo teste de Wilcoxon. As letras, na linha, representam as diferenças significativas entre os métodos de processamento (quente e frio) para cada tipo de nota como escala hedônica (1 a 9) e da intensidade (-2 a 2) para cada atributo.

Rodrigues e Moretti (2008) comentaram que porcentagens elevadas de proteína em bebidas de soja agregam aspectos sensoriais negativos. Dessa forma, compreende-se a preferência pelos provadores do EHS produzido pelo método de extração a quente, o qual apresentou teor proteico relativamente baixo (1,2 %) quando comparado ao EHS produzido pelo método de extração a frio (2,6 %).

O EHS- extração a quente foi avaliado pelos provadores e 50 % deles deram nota acima de 7 para aparência, indicando que gostaram regularmente (7) a muitíssimo (9), nota acima de 6 para os atributos aroma, sabor, consistência e avaliação global, demonstrando que gostaram entre ligeiramente (6) a muitíssimo (9) dessa bebida. Para acidez e doçura as notas ficaram acima de 5, indicando que parte dos provadores foram indiferentes (5) a gostaram muitíssimo (9) desses atributos no EHS.

Em relação ao EHS - extração a frio, 63 % dos provadores deram nota abaixo de 4 para o atributo sabor, indicando que desgostaram muito a desgostaram ligeiramente dessa bebida e um dos critérios de eliminação do tratamento seria quando a maioria dos provadores avaliassem o produto com nota igual ou menor que 4. Dessa maneira, o método selecionado para produzir o EHS nos próximos experimentos foi o de extração a quente.

O teste de intensidade (Tabela 4) indicou que todos os atributos avaliados do EHS – extração a quente estavam intensos da maneira que os provadores gostavam (nota 0), com exceção do atributo doçura, caracterizado como um pouco menos intenso da maneira que os provadores gostavam (nota -1), demonstrando que os provadores

preferem bebidas mais adocicadas. Brunelli e Venturini Filho (2012) concordaram com essa observação, pois ao realizar a análise sensorial de bebida mista de soja e uva com diferente teor de sólidos solúveis (10, 12 e 14 °Brix) obtiveram as maiores notas para a bebida com 14 °Brix.

O EHS- extração a frio apresentou aparência e aroma um pouco mais intenso do que os provadores gostavam, já o sabor, a doçura e a avaliação global foi um pouco menos intensa do que gostavam, restando apenas à acidez e a consistência na intensidade que gostavam (Tabela 4). Tais observações justificaram os resultados medianos baixos das notas dos atributos avaliados a partir do teste da escala hedônica. Dessa forma, como o EHS- extração a quente obteve maior aceitação pelos provadores, esse método foi selecionado para produzir o EHS dos próximos experimentos.

6.3-Experimento 3

Esse experimento foi dividido em etapas (1 e 2). Na etapa 1 (tópico 6.3.1 – com sub-tópicos a, b, c e d) foram apresentados os resultados das análises realizadas para o EHS. A etapa 2 (tópico 6.3.2- com sub-tópicos a,b, c e d) foi representada pelos resultados obtidos das análises do suco de uva.

6.3.1- Etapa 1 (Doses de radiação em EHS)

Nessa etapa foram realizadas as análises físico-químicas (Tabela 5, Figura 15 e 16), bioquímicas (Figura 17), microbiológicas (Tabela 6) e sensoriais (Tabela 7) dos EHS submetidos a diferentes doses de radiação gama (2, 4 e 8 kGy), sendo zero o grupo controle.

a) Análise físico-química

O aumento da dose de energia ionizante não interferiu na maioria dos parâmetros avaliados, com exceção do pH, acidez e proteína (Tabela 5). O pH e acidez são parâmetros inversamente proporcionais. O motivo pelo qual os valores do pH reduziram enquanto os da acidez aumentaram ao elevar a dose de radiação, pode estar associado ao tempo de exposição aos raios gama. Este tipo de energia pode induzir mudanças na

estrutura das moléculas, como a separação dos ácidos fenólicos complexados a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007), tornando-se mais disponíveis na solução e facilitando sua detecção.

Tabela 5. Valores médios seguidos dos desvios padrões das determinações físico-químicas de EHS irradiado nas doses de 0, 2, 4 e 8 kGy .

| Determinações (%) | EHS- doses kGy* | | | |
|----------------------------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 |
| Kcal | 59,01±0,44 | 58,73±1,91 | 59,02±1,33 | 58,24±1,96 |
| Umidade (%) | 85,65 ± 0,07 | 85,84 ± 0,49 | 85,84 ± 0,51 | 85,87 ± 0,44 |
| Cinzas (%) | 0,38 ± 0,00 | 0,39 ± 0,01 | 0,41 ± 0,01 | 0,42 ± 0,02 |
| Sólidos totais (%) | 14,35 ± 0,07 | 14,51 ± 0,01 | 14,36 ± 0,05 | 14,28 ± 0,06 |
| Sólidos solúveis (°Brix) | 14,17 ± 0,12 | 14,03 ± 0,25 | 14,17 ± 0,06 | 13,97 ± 0,31 |
| pH | 4,79 ± 0,02 a | 4,74 ± 0,08 ab | 4,66 ± 0,04 bc | 4,58 ± 0,02 c |
| Acidez)g 100 mL ⁻¹) | 0,27 ± 0,01 c | 0,28 ± 0,01 bc | 0,33 ± 0,01 b | 0,38 ± 0,01ab |
| Lipídios (%) | 0,63 ± 0,03 | 0,73 ± 0,04 | 0,80 ± 0,13 | 0,68 ± 0,11 |
| Proteína (%) | 1,29 ± 0,09 a | 1,17 ± 0,03ab | 1,09 ± 0,05ab | 0,96 ± 0,06 b |
| Carboidratos (%) | 12,05±0,04 | 11,88±0,42 | 11,86±0,59 | 12,08±0,40 |

As letras (linha) representam as diferenças significativas entre os EHS com diferentes doses de radiação (0, 2, 4 e 8) a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni. Ausência de letra: não houve diferença significativa. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

A acidez do EHS é próxima de 0,05 % (ABREU *et al.*, 2007; RODRIGUES; MORETTI, 2008). Entretanto os resultados da acidez obtidos nesse trabalho foram maiores pela adição do ácido ascórbico e do suco concentrado de maçã, que contém ácidos orgânicos.

A redução significativa do teor de proteína ao elevar a dose de radiação (Tabela 5) pode estar vinculada a deaminação, onde forma-se amônia a partir da ruptura das ligações peptídicas do grupo amina com o aminoácido (SIDDHURAJU; MAKKAR; BECKER, 2002). Contudo, a deaminação melhora a qualidade nutricional do alimento, por tornar a proteína mais hidrofílica, aumentando sua solubilidade e digestibilidade. Toledo *et al.* (2007) ao analisarem alguns cultivares de soja, dentre eles o BRS-213, encontraram aumento gradual da deaminação ao elevar as doses de radiação gama em 2, 4 e 8 kGy.

Embora o resultado do teor de proteína tenha reduzido ao elevar a dose de radiação (Tabela 5), a qualidade da mesma pode ter melhorado, pois há relatos na

literatura que a radiação gama aumenta a solubilidade, o poder de emulsificação e a estabilidade da proteína (PEDNEKAR *et al.*, 2010).

Os EHS apresentaram reduzido teor de lipídios (Tabela 5), pois essa macromolécula possui características hidrofóbicas, dificultando sua solubilização em água (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009). Além disso, o método de extração do EHS exige elevada temperatura para desnaturar os inibidores (Kunitz e Bowman-Burk) das enzimas digestivas, tripsina e quimiotripsina (BRUNE *et al.*, 2010), a qual pode aumentar a interação carboidrato-proteína, pela reação Mailard (SHIBAO; BASTOS, 2011) e a interação proteína-proteína, tornando-as menos solúveis (BENASSI; PRUDÊNCIO; VARÉA, 2012). Como consequência dessas interações, tais macromoléculas ficarão retidas no *okara* e menos disponíveis na bebida.

O teor de carboidratos apresentados no EHS foi decorrente da adição de suco concentrado de maçã, utilizado para adoçar a bebida, pois o EHS contém poucos açúcares (RODRIGUES; MORETTI, 2008). Achouri *et al.* (2008) e Barros (2012) encontraram teores de proteína mais elevados nas faixas de 3,3 a 4,2 %, e 3,0 a 5,5 %, respectivamente, quando comparado aos resultados do presente ensaio (Tabela 5). Os primeiros autores utilizaram uma máquina que produz EHS (*vaca mecânica*), a qual possui uma centrífuga que auxilia na extração dos nutrientes. Já a segunda autora utilizou o método de extração a frio e uma proporção soja:água diferente, fatores que interferem na composição final do produto.

O EHS puro, sem aditivos, apresentando apenas a cor clara da soja, por esse motivo o valor da luminosidade foi maior para essa bebida (Figura 15). Por outro lado, os EHS suplementados com aditivos (suco concentrado de maçã, ácido ascórbico, tocoferol e estabilizantes) apresentaram leve escurecimento, constatado pela redução dos valores de luminosidade. O aditivo que provavelmente mais contribuiu com esse escurecimento foi o suco concentrado de maçã (Figura 1), por apresentar cor marrom (caramelizada), decorrente das reações de Maillard (SHIBAO; BASTOS, 2011).

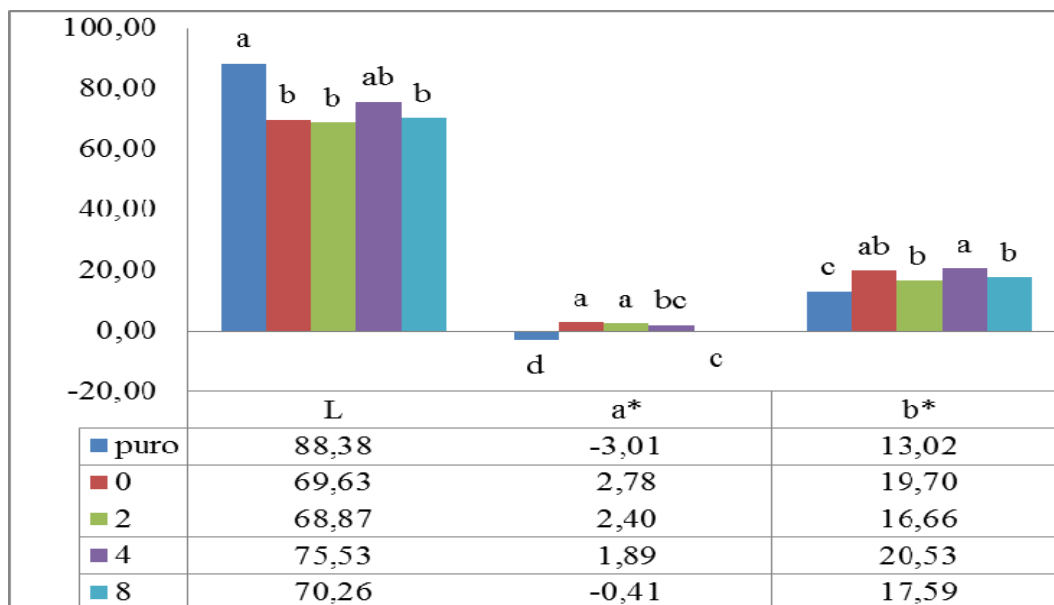


Figura 15. Valores de luminosidade (L), cor vermelha (+) ou verde (-) representado pelo índice a*, cor de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b*, de EHS puro (sem aditivos) e EHS (com aditivos) submetidos a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

Tashima e Cardello (2003) analisaram EHS adoçado com sacarose e com sucralose, e constataram que ambos os adoçantes não interferiram na cor, mantendo a tonalidade característica da soja. Os autores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados para o EHS puro comparados aos obtidos neste ensaio (Figura 15) para o índice a* e b*, em torno de 1 e 12, respectivamente.

O resultado positivo do índice a* e b* para os EHS 0, 2 e 4 indica que as amostras apresentaram coloração amarela avermelhada (Figura 15), sendo a cor amarela característica da cultivar de soja e a cor avermelhada decorrente da adição do suco concentrado de maçã. Da mesma forma, o tocoferol mesmo adicionado em pequenas quantidades (0,05 g 100 mL⁻¹) pode ter contribuído na cor avermelhada (Figura 2). Já o EHS submetido à dose de 8 kGy apresentou o índice a* negativo (Tabela 15), caracterizando a cor da amostra como amarela esverdeada. Nesse caso, o tom de verde foi pouco representativo, pois o valor ficou próximo a zero. Por outro lado, essa amostra continha menor porcentagem de proteína e lipídios que as demais, as quais estão relacionadas à cor da amostra (MA *et al.*, 2015).

O índice a* teve seus valores reduzidos pela submissão dos EHS às diferentes doses de radiação gama, indicando que os tons avermelhados ficaram mais

claros (Figura 15). O mesmo foi confirmado para as tonalidades cromáticas-°Hue (Figura 16), sendo que o aumento dos resultados contribuiu na redução dos tons alaranjados (faixa de 54 a 90 °), acentuando o tom amarelo do EHS (faixa de 90 a 126°). Tais variações foram visualizadas quando elevou-se as doses (2, 4 e 8 kGy), sendo que apenas não diferiu a tonalidade do EHS controle (0) com o EHS submetido a 2 kGy (Figura 16). Contudo, Lee *et al.* (2007) ao investigarem a interferência de diferentes doses de radiação (10 a 30 kGy) sobre as moléculas de arroz, concluíram que elevar as doses aumentou os tons amarelos (índice b), pois a radiação gama foi capaz de romper as ligações glicosídicas dos carboidratos ou oligossacarídeos, originando produtos radiolíticos capazes de transformar a coloração da amostra.

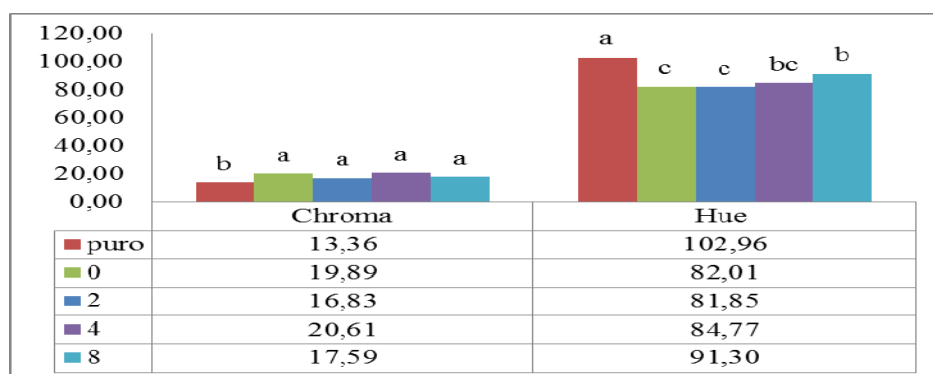


Figura 16. Valores de saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática (°Hue) de EHS puro (sem aditivos) e EHS (com aditivos) submetidos a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

O EHS puro apresentou seu °Hue no tom predominantemente amarelo, por não ser suplementado com os aditivos. Já a saturação de cor obteve o menor resultado quando comparado aos outros tratamentos, indicando menor grau de pigmentação, sendo esse EHS mais opaco e com tom mais fraco que os demais. No entanto, a amostra que se mostrou mais saturada (intensa e brilhante), ou seja, com cor mais vibrante foi o EHS submetido à dose de 4 kGy, característica permitida pela adição do suco concentrado de maçã e pelas possíveis reações de Maillard desencadeadas pela radiação. Em contrapartida, na dose 8 kGy houve a redução do índice Chroma do EHS (Figura 16), pelo destaque do tom amarelo, originado pela redução das melanoidinas (presentes no EHS-4kGy) a partir dos glicosídios radiolíticos (LEE *et al.*, 2007)

b) Análise bioquímica

Os resultados do EHS controle (Figura 17) para os compostos fenólicos e capacidade antioxidante ficaram aquém aos resultados (1,36 a 1,83 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) encontrados por Ma e Huang (2014), os quais utilizaram o método de extração a frio que é capaz de extrair mais sólidos solúveis. Contudo, esses autores observaram que a capacidade antioxidante (DPPH) quantificada em EHS está relacionada aos compostos fenólicos e agliconas (flavonóides) presentes no mesmo.

Ao comparar o EHS controle com as amostras irradiadas apenas a bebida submetida a 8 kGy apresentou diferença significativa no teor dos compostos fenólicos. Entretanto, mesmo demonstrando redução de 34 % do teor dos compostos fenólicos (antioxidantes) a capacidade antioxidante do EHS manteve-se estável ao receber as diferentes doses de radiação gama (Figura 17). Tewari *et al.*, (2014) ao irradiarem a soja até 1 kGy não notaram diferença nos compostos fenólicos quando comparados ao controle, resultados que foram semelhantes ao deste estudo para a dose de 2 e 4 kGy.

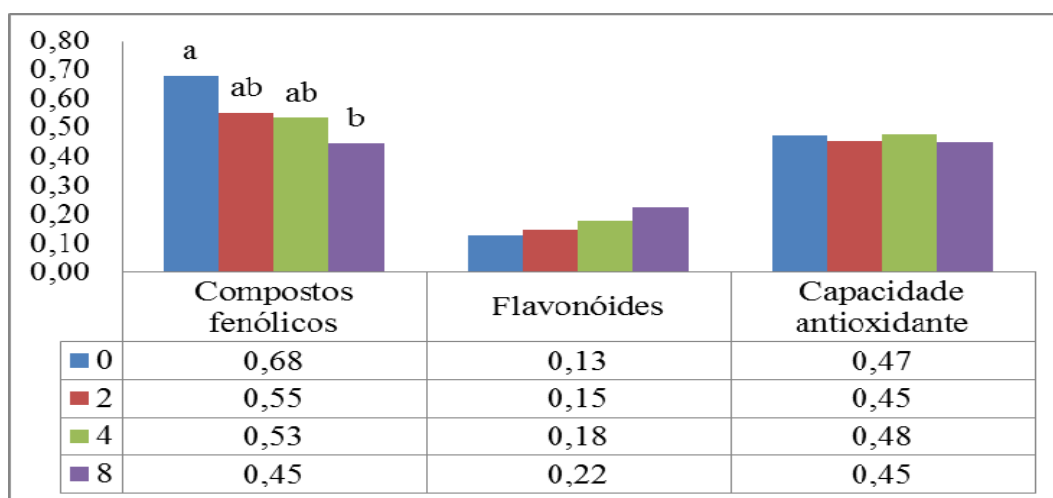


Figura 17. Valores médios de EHS submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy) para os componentes bioquímicos (compostos fenólicos- mg mL^{-1} ; flavonóides- mg mL^{-1} ; e capacidade antioxidante- $\mu\text{mol mL}^{-1}$ amostra). Ausência das letras indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

As doses de radiação não interferiram significativamente no teor de flavonóides do EHS, embora a bebida submetida a 8 kGy tenha aumentado 69% o teor desse componente quando comparado ao controle (Figura 17). Contudo, Variyar *et al.*

(2004) observaram aumento no teor de agliconas ao elevar a dose de radiação gama de 0,5 a 5 kGy, indicando que a radiação induziu a ruptura dos glicosídeos em isoflavonas livres, as quais possuem maior capacidade antioxidante. Dessa maneira, é possível compreender o motivo de reduzir os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante não variar com o aumento da dose de radiação.

O tratamento térmico utilizado para produzir os EHS pode ter catalisado a reação de hidrólise dos beta-glicosídeos pela enzima beta-glicosidase (ZHANG; CHANG; LIU, 2015), formando agliconas e essas associadas ao teor de outros compostos fenólicos ($0,68 \text{ mg mL}^{-1}$) do EHS (controle) podem justificar a elevada atividade antioxidante associada a este tratamento (Figura 17). Nesse caso, para comprovar se o método de produção do EHS e a técnica de conservação (doses de radiação gama) interferiram no aumento das agliconas, seria necessário analisar por cromatografia as isoflavonas presentes no EHS. Isto se justifica, pois a bebida com mais agliconas seria considerada mais saudável pelo fato de serem moléculas de baixo peso molecular e assim, absorvidas mais facilmente pelo corpo humano (KANO *et al.*, 2006).

c) Análise microbiológica

A ausência de microrganismos (Tabela 6) do EHS com tratamento controle (zero) indica alta eficiência do tratamento térmico (binômio: tempo/temperatura) utilizado no processamento da soja. Após o engarrafamento, os EHS foram submetidos às doses de radiação gama, técnica de conservação capaz de induzir a morte das células microbianas a partir da radiação ionizante (LIMA FILHO *et al.*, 2012).

Embora a contagem para os bolores, leveduras e microrganismos esporulados (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) tenha sido ausente (Tabela 6), já se conhece que entre as doses utilizadas (2 a 8 kGy) os esporos mantêm-se resistentes (GROLICHOVA; DVOŘÁK; MUSILOVA, 2004), bem como alguns fungos filamentosos e leveduriformes (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados obtidos podem demonstrar a eficiência do tratamento térmico sobre a eliminação dos microrganismos ou ser devido às condições que foram mantidos os EHS antes de serem analisados, pois após a irradiação, os EHS foram congelados até o momento das análises e a temperatura reduzida não permite crescimento microbiológico.

Tabela 6. Resultados médios da contagem microbiológica de EHS submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy).

| Microrganismos | EHS | | | |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 2 | 4 | 8 |
| <i>Salmonella SP</i> | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Coliformes totais | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Coliformes termotolerantes | <10 | <10 | <10 | <10 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Bolores e leveduras | <10 | <10 | <10 | <10 |
| <i>Bacillus cereus</i> | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Bactérias mesófilas | <10 | <10 | <10 | <10 |

Ribeiro *et al.* (2009) ao analisarem farelo de soja irradiado observaram que as leveduras foram eliminadas a partir de 3,5 kGy e os fungos filamentosos a partir de 8 kGy. Já Yun *et al.* (2012) contaram em grãos de soja <10 unidades formadoras de colônias de (UFC) e ausência de bolores e leveduras nas doses de 3 e 5 kGy, respectivamente. Quanto às bactérias aeróbias totais, a contagem foi <10^{UFC} e ausência nas doses de 5 e 10 kGy, respectivamente. Entretanto, nesse experimento houve ausência de bolores, leveduras e bactérias mesófilas nos EHS, independentemente do tratamento.

d) Análise sensorial

Desconsiderando as possíveis interferências da radiação gama sobre as características organolépticas da bebida, pode-se notar pela amostra do tratamento controle que a maioria dos provadores gostou da mesma, já que todos os atributos receberam notas acima de 6 (gostaram ligeiramente a muitíssimo) por pelo menos 50 % dos provadores (Tabela 7), indicando que o método de extração do EHS foi eficiente em manter a estabilidade sensorial da bebida.

Embora os consumidores estejam aceitando mais bebidas a base de soja (BEHRENS; DA SILVA, 2004), a população ocidental ainda se restringe a essa bebida por associá-la ao sabor e aroma de feijão (*beany flavour*). Por esse motivo, mesmo o EHS controle, obteve nota de 1 a 6, indicando que 50 % dos provadores desgostaram a gostaram ligeiramente da bebida. Isso porque quando ocorre à oxidação térmica, ocasionada pelo método de produção do EHS, as substâncias originadas a partir da

oxidação lipídica, de aminoácidos, açúcares e do ácido ferúlico conferem notas verdes e de ácidos graxos como compostos de aroma do EHS (KANEKO; KUMAZAWA; NISHIMURA, 2011).

Tabela 7. Mediana das notas dos atributos dos EHS submetidos a diferentes doses de radiação (0, 2, 4 e 8 kGy).

| Atributos | EHS | | | | | | | |
|------------------|------------------------------|----|----|----|-----------------------------------|------|-----|----------------|
| | Doses- kGy (Escala Hedônica) | | | | Doses- kGy (Teste da Intensidade) | | | |
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 0 | 2 | 4 | 8 |
| Aparência | 6a | 6a | 7a | 7a | 1a | 1ab | 0b | 0b |
| Aroma | 6a | 6a | 6a | 5b | 0a | 0a | -1a | 1 ^a |
| Sabor | 6a | 6a | 6a | 4b | 0a | -1ab | 1ab | 2b |
| Avaliação global | 6a | 6a | 5a | 5a | 1a | 1b | -1b | 1b |

Considera-se um nível de significância de 0,05 pelo teste de Friedmann. As letras, na linha, representam as diferenças significativas entre os EHS com diferentes doses de radiação para cada tipo de nota, como escala hedônica (1 a 9) e da intensidade (-2 a 2), para cada atributo.

Quando a bebida foi irradiada até 4 kGy as notas (escala) permaneceram, em sua maioria, em 6 (gostei ligeiramente), ou seja, o aumento da dose até 4 kGy para o sabor do EHS, não o diferiu do controle. Já a amostra irradiada a 8 kGy, a maioria dos provadores, perceberam diferença no paladar quando comparado ao controle, ficando as notas em torno de 4, que significa desgostei ligeiramente (Tabela 7). Tal resultado contrariou as notas da análise sensorial obtidas por YUN *et al.* (2012), pois não encontraram diferença significativa para o atributo sabor ao submeterem os grãos de soja as doses de 1 a 10 kGy. Provavelmente o motivo desse resultado foi pela baixa porcentagem de umidade presente nos grãos quando comparados ao EHS, evitando a oxidação.

A radiação gama pode provocar a radiólise da água, formando radicais livres (radical hidroxila, hidroperóxido e elétron hidratado), responsáveis por gerar fatores interferentes (off-flavor) ao paladar e aroma da amostra (TEWARI *et al.*, 2014). As substâncias originadas somente foram perceptíveis a partir da dose 8 kGy, pois os provadores passaram a desgostar do EHS (Tabela 7). Possivelmente os resultados medianos para o atributo aroma e sabor nas doses 2 e 4 kGy foram iguais ao controle devido a adição do ácido ascórbico e do tocoferol, os quais são considerados antioxidantes e quando associados exercem sinergismo, aumentando seu potencial antioxidante

(BERTOLIN *et al.*, 2011). Dessa forma, a atividade antioxidante dos mesmos foi eficiente sobre os possíveis radicais livres produzidos por estas doses de radiação gama.

O motivo da maioria dos provadores acharem o aroma mais intenso (1) e o sabor muito mais intenso (2) do que estão acostumados do EHS submetido a 8 kGy foi possivelmente resultante da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na bebida, reação catalisada por radicais livres originados pela radiação gama. Apesar de estes radicais livres e hidroperóxidos não terem nenhum sabor, a sua cisão produz aldeídos e cetonas de aroma e sabor acentuados (ALMEIDA-MURADIAN; PENTEADO, 2007). Além disso, os autores descreveram o sabor de amostras oxidadas como rançoso, de peixe, oleoso e metálico.

Diante desses resultados a dose 8 kGy foi eliminada como opção de técnica de conservação para a bebida mista que foi produzida e avaliada no experimento 4, pois o critério era descartar o tratamento que obtivesse nota igual ou abaixo de 4 (indicando o desgostar da bebida). A dose de radiação gama que se destacou para o EHS foi 4 kGy, por manter as características sensoriais semelhantes ao controle e por fornecer mais energia que a dose 2kGy, diminuindo a possibilidade de crescimento microbológico na amostra.

6.3.2- Etapa 2 (Doses de radiação em Suco de uva)

Nessa etapa foram realizadas as análises físico-químicas (Tabela 8 e Figura 18), bioquímicas (Figura 19), microbiológicas (Tabela 9) e sensoriais (Tabela 10) dos sucos submetidos às diferentes doses de radiação gama (2, 4 e 8 kGy), sendo zero o controle.

a) Análise físico-química

A legislação permite um erro de 20 %, para mais ou para menos, nos valores dos componentes nutricionais informados nos rótulos dos produtos em relação ao encontrado na análise (BRASIL, 2003). Dessa maneira, segundo a TACO (2011), tabela brasileira de composição dos alimentos, o suco de uva apresenta 85 % de umidade, 58 Kcal, traços de proteína e lipídios, e 0,2 % de cinzas. Diante dessas determinações, os resultados obtidos para os sucos do presente experimento ficaram de acordo com a TACO

em relação a umidade e cinzas. Já a caloria ultrapassou para todas as amostras os 20 % a mais do permitido pela legislação com exceção do suco submetido a 2 kGy. Como a caloria é calculada a partir da quantidade de proteína, lipídios e açúcares, e o suco do tratamento 2 kGy apresentou menor porcentagem de açúcares que os sucos dos demais tratamentos, logo, o seu valor da caloria foi menor.

A porcentagem da umidade variou entre os tratamentos, com destaque para suco submetido a 2 kGy. Porém, essa variação não se deve a interferência da radiação gama e sim ao método de produção do suco (Tabela 8), o qual foi obtido em panela extratora. Esse equipamento usa vapor d' água, que por arraste extrai os componentes da uva para o suco, sendo que essa água exógena (incorporada ao suco) pode variar no decorrer da extração do suco (BRESOLIN; GULARTE; MANFROI, 2013).

Tabela 8. Valores médios seguidos do desvio padrão da composição físico-química de suco de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy).

| Determinações (%) | Suco- dose (kGy) | | | |
|---------------------------------|--------------------------|----------------|------------------------|-----------------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 |
| Kcal | 73,48±1,00b | 59,88±0,49c | 78,35±,82 ^a | 76,28±0,68ab |
| Umidade (%) | 81,54 ± 0,29 b | 85,12 ± 0,13 a | 80,32 ± 0,18 c | 80,82 ± 0,18 bc |
| Cinzas (%) | 0,18 ± 0,04 | 0,20 ± 0,01 | 0,19 ± 0,03 | 0,22 ± 0,01 |
| Sólidos totais (%) | 18,46 ± 0,29 b | 14,88 ± 0,13 c | 19,68 ± 0,18 a | 19,18 ± 0,18 ab |
| Sol. solúveis(°Brix) | 18,45 ± 0,05 c | 14,93 ± 0,10 d | 20,62 ± 0,06 a | 19,37 ± 0,08 b |
| pH | 3,55 ± 0,01 ^a | 3,49 ± 0,01 b | 3,59 ± 0,03 a | 3,44 ± 0,01 c |
| Acidez (g 100mL ⁻¹) | 0,58 ± 0,02 c | 0,69 ± 0,01 b | 0,72 ± 0,01 b | 0,90 ± 0,01 c |
| “Ratio” | 32,10 ± 0,83 a | 21,64 ± 0,24 b | 28,71 ± 0,54 a | 21,46 ± 0,23 b |
| Lipídios (%) | 0,07 ± 0,00 ab | 0,06 ± 0,01b | 0,07 ± 0,00 ab | 0,08 ± 0,00 a |
| Proteína (%) | 0,21 ± 0,06 | 0,15 ± 0,03 | 0,18 ± 0,00 | 0,20 ± 0,01 |
| Açúcares totais (%) | 17,00±0,32 | 14,47±0,07 | 19,24±0,02 | 18,68±0,16 |

* Considera-se um nível de significância de 0,05 pelo teste de Bonferroni. As letras, na linha, representam as diferenças significativas entre os EHS com diferentes doses de radiação.

Ao comparar os tratamentos, como os valores médios da umidade do suco submetido a 2 kGy foi diferente dos demais, conseqüentemente o mesmo ocorreu para os açúcares totais, grande representante dos sólidos totais e solúveis (Tabela 8). Dessa forma, a diferença dos resultados da composição físico-química entre os tratamentos não é resultante das diferentes doses de radiação gama, mas sim pelo método de extração do suco. A acidez titulável, diferentemente, apresentou aumento quando se elevou a dose de radiação gama, já que a mesma é capaz de induzir mudanças na estrutura das moléculas,

como a separação dos ácidos fenólicos complexados a açúcares e proteínas, possibilitando sua detecção nessa análise (ANGELO; JORGE, 2007). Este resultado concorda com Arje, Barzegar e Ali Sahari (2015), que ao analisarem suco de cereja irradiado (0,5 a 6 kGy), observaram que o aumento da dose de radiação induziu o aumento dos ácidos orgânicos, principalmente o ácido málico e oxálico, elevando a acidez total.

Özcan, Alpar e Al Juhaimi (2015) analisaram suco de variedades de uva da Turquia e encontraram resultados superiores de proteína (0,44 %), acidez (1,26 %) e pH (7,46) aos observados nesse experimento (Tabela 8). Entretanto, a composição físico-química do suco pode variar dependendo da variedade da uva, da maturação, condições edafo-climáticas e tecnologia empregada na extração (MARZAROTTO, 2010).

Os resultados dos parâmetros avaliados para os sucos de uva (tabela 8) ficaram em conformidade aos limites estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2000; 2010), a qual exige que a acidez total mínima seja 0,41 % e a máxima 0,90 %, sólido solúvel mínimo de 14 °Brix, açúcares totais máximo de 20 % e “*Ratio*” (sólidos solúveis/acidez) máximo de 45 e mínimo de 15.

Dutra *et al.* (2014) produziram também suco de uva com a variedade Isabel precoce em panela extratora e encontraram valores próximos ao desse estudo (Tabela 8) para sólidos solúveis (14,6 °Brix), acidez titulável (0,63 %) e pH (3,33).

Lima *et al.* (2015) ao utilizar diferentes temperaturas na produção do suco de uva encontraram redução das antocianinas na maior temperatura. Dessa maneira, a amostra que representou essas alterações nas antocianinas e por consequência na cor, foi o suco de uva controle, não constando as possíveis interferências causadas pela radiação. Gurak *et al.* (2008) analisaram sucos uva tinta comerciais e obtiveram resultados de luminosidade próximos aos encontrados nesse experimento (Figura 18).

Os resultados da luminosidade, do índice a*, b*, c* e do °Hue demonstraram que as doses de radiação interferiram na cor do suco de uva (Figura 18) e o seu principal representante de cor é a antocianina (MALACRIDA; MOTTA, 2006), a qual possivelmente apresentou alta porcentagem de degradação quando exposta a irradiação (MOHAJER *et al.*, 2014).

O aumento das doses de radiação gama deixaram a bebida mais clara, ficando o suco de uva controle com menor valor de luminosidade e dose de 8 kGy com o maior valor (Figura 18). Contudo, Arjeh, Barzegar e Ali Sahari (2015) ao submeter suco de cereja a diferentes doses de radiação gama (0,5 a 6 kGy) também tiveram o

resultado da luminosidade aumentado, decorrente das alterações ocorridas com as antocianinas.

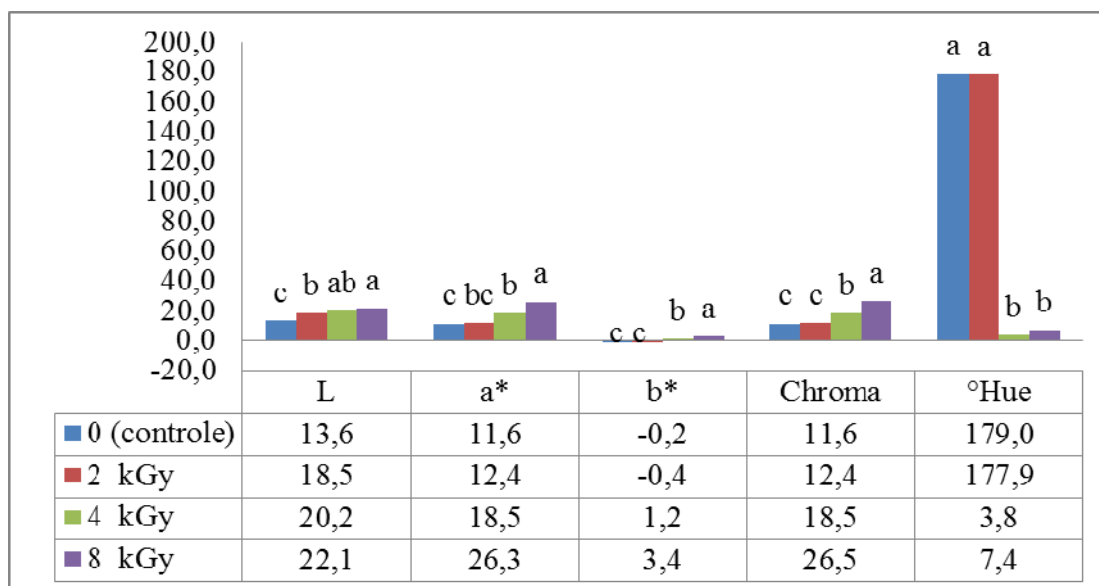


Figura 18. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a*, intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b*, saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática (°Hue) de suco integral de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

O índice a* positivo demonstrou que os sucos de uva apresentaram cor vermelha. Além disso, houve aumento gradual ao elevar a dose de radiação, possibilitando observar que houve alteração nos tons de vermelho. O suco de uva irradiado apresentou resultados para o índice a* semelhantes aos de néctares de uva (MAMEDE *et al.*, 2013). O índice b negativo para os sucos controle e submetido a 2 kGy demonstrou tons azulados, indicando que são mais escuros que os sucos submetidos a 4 e a 8 kGy, os quais constaram o índice b* positivo (Figura 18).

Elevar as doses de radiação induziu o aumento da saturação de cor (índice Chroma), indicando que as amostras de sucos ficaram com tons mais vibrantes. Já as tonalidades cromáticas (°Hue) tiveram seus resultados reduzidos, indicando que a amostra perdeu seus tons azulados (suco controle e submetido a 2 kGy) e ganhou tons vermelho arroxeados (MINOLTA, 1998). Neste sentido, as alterações promovidas pelos raios gamas, os quais podem ter aumentado os grupos metoxilas nas formas estruturais das antocianinas, promovendo a mudança da cor azul para rosa da amostra ou favorecendo a

hidrólise glicosídica das antocianinas o que também caracteriza a perda da cor das mesmas (LEE *et al.*, 2009; MALACRIDA, MOTTA, 2006).

b) Análise bioquímica

Lima *et al.* (2014) quantificou o teor de compostos fenólicos (0,78 mg mL⁻¹), flavonóides (0,11 mg mL⁻¹) e a capacidade antioxidante (10 mmol TEAC L⁻¹) em suco da variedade Isabel Precoce. Os resultados ficaram aquém dos obtidos nesse experimento (Figura 19), embora seja a mesma variedade de uva, a técnica de processamento foi diferente o que possivelmente contribuiu na distancia entre os valores para os referidos parâmetros. Por outro lado, alguns autores quando analisaram sucos comerciais de uvas tintas brasileiras (GRANATO *et al.*, 2015) e espanholas (MORENO-MONTORO *et al.*, 2015) encontraram resultados que foram semelhantes aos desse experimento para compostos fenólicos (1,2 e 1,17 mg mL⁻¹) e flavonóides (0,5 e 0,9 mg mL⁻¹), respectivamente.

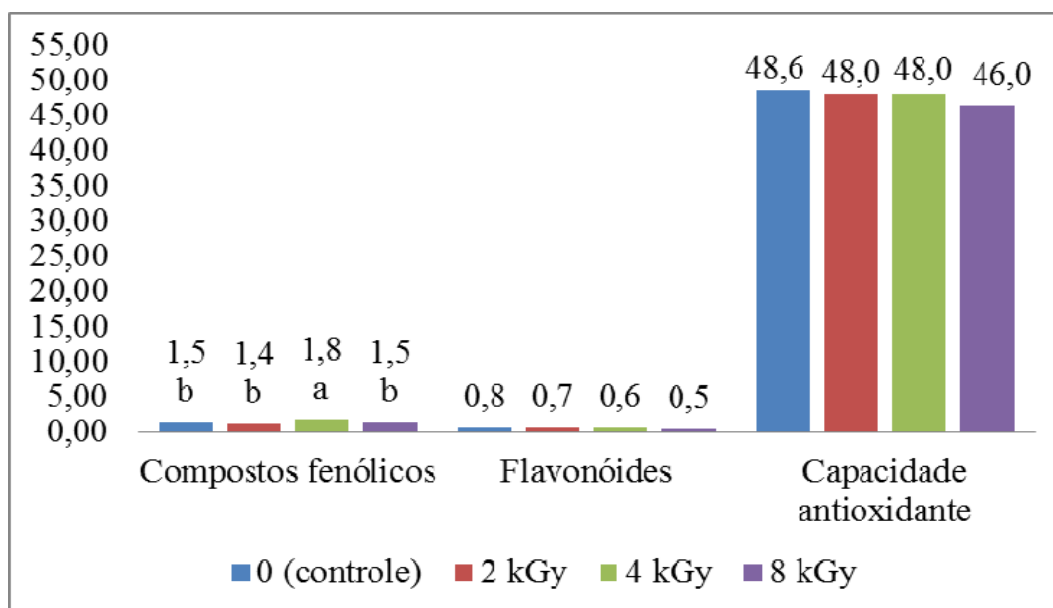


Figura 19. Valores médios de suco integral de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy) para os componentes bioquímicos (compostos fenólicos- mg mL⁻¹; flavonóides- mg mL⁻¹; e capacidade antioxidante- mmol TEAC L⁻¹). As letras representam as diferenças significativas entre os sucos com diferentes doses de radiação ($p \leq 0,05$) a partir do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

A radiação gama induziu aumento significativo dos compostos fenólicos na dose de 4 kGy, já na dose de 8 kGy o teor manteve-se próximo ao encontrado para o suco controle (Figura 19). SONG *et al.* (2006) exibiram condição similar para suco de cenoura irradiado a 3 kGy, que demonstrou aumento do teor dos compostos fenólicos e a 5 kGy a manutenção do teor quando comparado ao controle, no momento inicial da estocagem. O aumento dos compostos fenólicos foi associado à ação da radiação gama, contribuindo a partir das moléculas maiores com a formação de várias moléculas menores, além da liberação dos compostos fenólicos que estavam complexados aos componentes glicosídicos pela ruptura de suas ligações (LEE *et al.*, 2009).

O suco controle quando comparado aos sucos submetidos às diferentes doses de radiação não apresentou diferença significativa para os teores de flavonóides e para a capacidade antioxidante (Figura 19). O mesmo efeito ocorreu para a capacidade antioxidante em sucos de cereja, os quais foram submetidos a variadas doses de radiação gama como 0,5 a 6 kGy (ARJEH; BARZEGAR; ALI SAHARI, 2015). Entretanto, ao fazer analogia dos resultados obtidos para o suco produzido pela panela extratora nesse experimento com outro método de produção (processamento de fluxo contínuo, envolvendo a trituração da uva, aquecimento, adição de enzimas pectinolíticas e centrifugação) foi possível notar que os autores encontraram valores maiores de flavonóides (antocianinas, catequina, epicatequina, quercetina, miricetina e kaempferol) com 2,12 mg mL⁻¹, dos compostos fenólicos com 3,38 mg mL⁻¹ e da capacidade antioxidante com 54 mmol TEAC L⁻¹ (TOALDO *et al.*, 2015).

c) Análise microbiológica

A contagem microbiológica dos sucos de uva adequou-se ao exigido pela legislação (RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001), a qual determina somente limites para Coliformes termotolerantes e Salmonella em suco de uva (BRASIL, 2001b), demonstrando ausência desses microrganismos para todos os tratamentos realizados (Tabela 9).

Sabe-se que o suco de uva por apresentar pH baixo pode apenas conter bolores, leveduras e bactérias ácido lácticas (MARZAROTTO, 2010). Contudo, o suco do tratamento controle apresentou contagem para bolores e leveduras, os quais apresentaram resistência térmica, já que para produzir o suco atingiu-se 85 °C. Entretanto,

mesmo contendo essa quantidade de fungos não houve produção de metabólitos, uma vez que as amostras ficaram refrigeradas até o dia das análises. Em temperaturas baixas, os microrganismos podem não estar na forma vegetativa, ou seja, não conseguindo se multiplicar ou produzir substâncias deteriorantes, permanecendo estável a qualidade organoléptica do suco, característica que permite a ingestão da bebida.

Tabela 9. Resultados médios da contagem microbiológica de suco de uva submetido a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy).

| Microrganismos | Suco | | | |
|------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 2 kGy | 4 kGy | 8 kGy |
| <i>Salmonella SP</i> | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Coliformes totais | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Coliformes termotolerantes | <10 | <10 | <10 | <10 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Bolores e leveduras | 2×10^3 UFC* | <10 | <10 | <10 |
| <i>Bacillus cereus</i> | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Bactérias mesófilas | <10 | <10 | <10 | <10 |

*UFC=unidades formadoras de colônia

Com exceção da presença dos bolores e leveduras, a ausência do restante dos microrganismos analisados no suco controle indicou que o método de extração do suco de uva foi eficiente para eliminá-los caso estivessem na bebida. Além disso, todas as doses de radiação gama foram capazes de reduzir a zero a carga microbiana dos sucos de uva (Tabela 8), caracterizando a bebida com padrões fitossanitários adequados ao consumo. Tal resultado se contrapôs ao observado por Alighourchi, Barzegar e Abbasi (2008) que ao irradiar (0,5 a 10 kGy) suco de romã obtiveram redução da população microbiana a partir da dose de 3,5 kGy.

d) Análise sensorial

O suco controle apresentou as maiores notas medianas dos atributos quando comparado aos sucos submetidos às doses de radiação gama. Os resultados encontrados para aparência e sabor do suco controle foram semelhantes (Tabela 10) aos resultados obtidos por PONTES *et al.* (2010), sendo seus valores médios 8 e 7,

respectivamente. Os autores analisaram sensorialmente sucos de uva comercializados no Brasil.

Os provadores gostaram mais da aparência da amostra controle do que a dos sucos irradiados, apresentando redução das notas da escala hedônica ao elevar a dose de radiação gama, sendo que somente a amostra 2 kGy não diferiu do controle. Os resultados indicaram para o atributo aparência, que os painelistas gostaram muito, gostaram regularmente, gostaram ligeiramente e desgostaram ligeiramente da amostra controle, 2, 4 e 8 kGy, respectivamente (Tabela 10). O motivo dos provadores desgostarem da aparência do suco irradiado a 8 kGy foi desencadeado pela radiação gama que alterou a cor dos sucos de uva (Figura 18 e 21) a partir das modificações ocorridas sobre as antocianinas (MOHAJER *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos pela escala hedônica indicaram que todas as doses de radiação gama (2, 4 e 8 kGy) interferiram significativamente no aroma, sabor e avaliação global dos sucos de uva quando comparados a amostra controle (Tabela 10). Entretanto, na literatura os relatos demonstram que não houve alteração significativa no perfil sensorial ao submeter até a dose de 5 kGy suco de vegetais (SONG *et al.*, 2007), suco de tamarindo (LEE *et al.*, 2009), suco de couve e ashitaba (*Angelica keiskei*) (JO; AHN; LEE, 2012) e suco de manga (NARESH *et al.*, 2014).

Tabela 10. Mediana das notas dos atributos dos sucos de uva submetidos a diferentes doses de radiação gama (0, 2, 4 e 8 kGy).

| Atributos | Suco de uva | | | | | | | |
|-----------------|------------------------------|-----|----|----|------------------------------------|------|------|-----|
| | Doses- kGy (Escala hedônica) | | | | Doses- kGy (Escala da Intensidade) | | | |
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 0 | 2 | 4 | 8 |
| Aparência | 8a | 7ab | 6b | 4c | 0a | 0ab | -1ac | -2d |
| Aroma | 8a | 5b | 6b | 4c | 0ab | 1a | -1ab | -1b |
| Sabor | 7a | 5b | 6b | 4b | 0a | 1a | -1a | -2b |
| Avaliação Geral | 8a | 6b | 6b | 4c | 0a | -1ab | -1b | -2c |

* Considera-se um nível de significância de 0,05 pelo teste de Friedmann. As letras, linha, representam as diferenças significativas entre os sucos com diferentes doses de radiação para cada tipo de nota, como da escala hedônica (1 a 9) e da intensidade (-2 a 2) para cada atributo.

Entre as amostras irradiadas o suco submetido a 4 kGy apresentou as maiores notas da escala hedônica para o aroma e sabor, indicando que pelo menos 50 % dos provadores gostaram ligeiramente a gostaram muito de ambos os atributos. Já o suco irradiado a 8 kGy apresentou para todos os atributos nota mediana 4, demonstrando que 50

% dos provadores deram nota entre 1 a 4, ficando os resultados entre desgostaram muitíssimo a desgostaram ligeiramente (Tabela 10). O que justifica as notas baixas para o suco de uva irradiado a 8 kGy são as substâncias formadas a partir da exposição a radiação gama que tornaram-se mais perceptíveis sensorialmente a partir da dose de 8 kGy. O mesmo efeito negativo foi confirmado por Lee *et al.* (2009) que ao submeter suco de tamarindo a 10 kGy as amostras apresentaram sabor e aroma acentuados (*off flavor*).

O suco submetido a 8 kGy apresentou intensidade inadequada ao critério dos provadores para todos os atributos, indicando que o sabor estava muito menos intenso do que gostavam para suco de uva, em contraste das amostras irradiadas a 2 e 4 kGy que não diferiram significativamente da amostra controle, a qual os provadores demonstraram que a intensidade estava da maneira que gostavam. Esses resultados discordaram dos obtidos por Verruma-Bernardi e Spoto (2003), que ao submeter suco de laranja até 3 kGy encontraram comentários na análise sensorial que a bebida irradiada apresentou *gosto de passado* ou cozido, sendo que essa característica foi descrita apenas para a amostra irradiada a 8 kGy nesse experimento.

Dessa forma, os resultados indicaram que entre as doses de radiação gama observadas nesse experimento, a de 4 kGy foi a mais adequada na manutenção da qualidade organoléptica do suco de uva, além de apresentar maior potencial esterilizante em relação a dose de 2 kGy, sendo esta dose selecionada para o experimento 4.

6.4- Experimento 4 (Bebida mista-Vida de prateleira)

Nesse experimento foram realizadas as análises físico-químicas (Tabela 11, 12, Figura 20, 21, 22, 23, 24 e 25), bioquímicas (Tabela 13 e 14), microbiológicas (Tabela 15) e sensoriais (Tabela 16, 17, 18, Figura 26 e 27) das bebidas mistas de extrato hidrossolúvel de soja e suco de uva irradiado a 4 kGy, mantidas na temperatura ambiente (24 °C) e sob refrigeração (4 °C), com ou sem adição de conservante.

a) Análise físico-química

A análise físico-química das amostras mantidas na temperatura ambiente (25 °C) com adição (AC) ou não de conservante (A) foi realizada somente no mês inicial da produção da bebida mista (Tabela 11), pois ambas já estavam deterioradas após 1 mês e 5 dias da data do processamento. Já as amostras mantidas sob refrigeração e principalmente as que tiveram adição de conservante (ácido benzóico) permaneceram adequadas ao consumo (sem metabólitos deteriorantes) no decorrer da vida de prateleira. Este resultado demonstrou que a amostra do tratamento que associou a técnica de radiação gama (4 kGy) com a refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) foi mais eficiente para a manutenção estável das características químicas da bebida mista de EHS e suco de uva (tabela 11 e 12). Esta prática evitou o crescimento microbológico, bem como a produção de metabólitos a partir das substâncias presentes nas bebidas o que levaria a alteração da composição físico-química e sensorial.

Tabela 11. Valores médios seguidos do desvio padrão da análise físico-química da bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (cinco dias após a produção do EHS), mantida a temperatura ambiente (A) e sob refrigeração a 4 °C (R) e com adição de conservante (AC e RC).

| Determinações | A | R | AC | RC |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Kcal | 56,61 \pm 0,92 | 57,96 \pm 1,03 | 56,57 \pm 0,45 | 57,30 \pm 1,17 |
| Umidade (%) | 85,96 \pm 0,14 | 86,00 \pm 0,28 | 85,98 \pm 0,15 | 85,93 \pm 0,39 |
| Cinzas (%) | 0,38 \pm 0,04 | 0,37 \pm 0,04 | 0,47 \pm 0,03 | 0,46 \pm 0,02 |
| Sólidos Totais (%) | 14,04 \pm 0,14 | 14,00 \pm 0,28 | 14,02 \pm 0,15 | 14,07 \pm 0,37 |
| Sól. Solúveis (°Brix) | 13,87 \pm 0,21 | 13,87 \pm 0,31 | 13,90 \pm 0,20 | 13,97 \pm 0,31 |
| pH | 4,26 \pm 0,04 | 4,12 \pm 0,13 | 4,22 \pm 0,05 a | 3,92 \pm 0,12 b |
| Acidez (g 100mL ⁻¹) | 0,55 \pm 0,08 | 0,66 \pm 0,20 | 0,60 \pm 0,04 | 0,75 \pm 0,13 |
| Lipídios (%) | 0,39 \pm 0,05 b | 0,69 \pm 0,16 a | 0,48 \pm 0,01 | 0,59 \pm 0,17 |
| Proteína (%) | 0,52 \pm 0,04 a | 0,40 \pm 0,06 b | 0,39 \pm 0,03 | 0,54 \pm 0,15 |
| Carboidratos (%) | 12,74 \pm 0,09 | 12,54 \pm 0,23 | 12,68 \pm 0,10 | 12,49 \pm 0,33 |

Letras minúsculas, na linha, comparam amostras mantidas em locais diferentes (A x R) e adição de conservante-ácido benzóico (AC x RC) pelo teste T.

O teor de lipídios e proteínas na bebida mista faz referência à qualidade nutritiva do EHS, já que o suco de uva apresenta traços dos tais parâmetros. Porém, ao misturar o EHS com o suco de uva, na proporção 1:1, ocorreu a redução do teor dessas macromoléculas em função do efeito diluidor. Da mesma maneira, ainda foi

necessário adicionar suco concentrado de maçã para corrigir os sólidos solúveis para 14 °Brix (Tabelas 11 e 12).

Somente o teor de lipídios e de proteínas foi diferente entre as amostras A e R (Tabela 11). Possivelmente, este efeito não pode ser atribuído exclusivamente às condições de temperatura (ambiente-25°C x refrigeração 4°C), mas provavelmente em função da técnica de produção artesanal do EHS e do suco de uva (Tabela 11 e 12). Porém, as amostras (AC e RC) com adição do conservante tiveram a contribuição do ácido benzóico na redução do pH e consequente aumento da acidez titulável quando comparadas com as amostras sem conservante (A e R) (Tabela 11).

Lima e Cardoso (2012) obtiveram valores para a Kcal (36,0) de bebida de soja e acerola enriquecida com cálcio inferiores aos resultados encontrados nesse estudo, apesar de apresentarem resultados maiores para lipídios (0,7 %) e proteína (0,8 %) a porcentagem dos carboidratos foi baixa (6,7 %).

Brunelli e Venturini Filho (2012) e Uliana (2009) ao analisarem bebida mista de EHS com suco de uva, e EHS com amora, respectivamente, encontraram resultados próximos aos obtidos nesse experimento (Tabela 11 e 12) para a umidade (85,47 e 85,94 %), lipídios (0,49 e 0,62 %), cinzas (0,34 e 0,45 %) e acidez (0,50 e 0,53 %). Os resultados de proteína foram semelhantes aos de Abreu *et al.* (2007), os quais avaliaram a composição química e físico-química em bebida mista de EHS e frutas tropicais e encontraram uma variação do teor de proteína entre 0,1 a 0,9 %. Esses autores não utilizaram a radiação gama como técnica de conservação em suas bebidas e mesmo assim houve proximidade dos resultados com os obtidos nesse trabalho, indicando que a dose de 4 kGy não interferiu na composição físico-química das amostras no decorrer da vida de prateleira.

Na literatura há alguns resultados para o teor de proteína, maiores (1 a 3 %) aos encontrados nesse experimento (Tabela 11 e 12). Estas porcentagens podem variar em função da proporção soja : água, utilizada no processamento do EHS, pois quanto menor o volume de água maior será o teor dos sólidos solúveis. Além disso, pode-se adicionar a proteína isolada da soja para enriquecer nutricionalmente a bebida (CALLOU *et al.*, 2010), ou utilizar a *vaca mecânica*, equipamento específico para produzir o EHS, o qual contribui na extração das macromoléculas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; RODRIGUES; MORETTI, 2008).

A composição físico-química das amostras mantidas sob refrigeração e sem adição do conservante (ácido benzóico) apenas não foi realizada no quinto e no nono mês, pois as mesmas tiveram contagem elevada de microrganismos, o que levou a deterioração das bebidas (Tabela 12).

Tabela 12. Valores médios da composição físico-química de bebida mista de EHS com suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração a 4 °C, com (RC) e sem (R) conservante no prazo de nove meses.

| Mese | Amostr | Determinações (%) | | | | | | | | |
|--------|--------|-------------------|-------|---------|-------|------|--------|-------|--------|-------|
| | | Kcal | *Umid | Cinzas | *SS | pH | *Acid. | *Lip. | *Prot. | *Carb |
| Inicia | R | 57,96 | 86,00 | 0,37 b | 13,87 | 4,12 | 0,66 | 0,69 | 0,40 | 12,64 |
| | RC | 57,39 | 85,93 | 0,46 aA | 13,97 | 3,92 | 0,75 | 0,59 | 0,54 | 12,58 |
| 1 | R | 56,60 | 86,11 | 0,42 | 13,80 | 4,20 | 0,53 | 0,55 | 0,51 | 12,41 |
| | RC | 56,82 | 85,99 | 0,35B | 13,90 | 4,11 | 0,67 | 0,43 | 0,43 | 12,80 |
| 2 | R | 56,49 | 86,21 | 0,39 a | 13,67 | 4,05 | 0,51 | 0,57 | 0,50 | 12,31 |
| | RC | 57,00 | 86,06 | 0,14 bC | 13,83 | 4,07 | 0,49 | 0,32 | 0,46 | 12,97 |
| 3 | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | RC | 56,27 | 86,18 | 0,32 B | 13,73 | 4,07 | 0,56 | 0,45 | 0,48 | 12,57 |
| 5 | R | 56,42 | 86,18 | 0,44 | 13,75 | 4,16 | 0,53 | 0,58 | 0,56 | 12,24 |
| | RC | 57,67 | 86,00 | 0,43 A | 13,88 | 4,13 | 0,52 | 0,67 | 0,51 | 12,39 |
| 7 | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | RC | 57,00 | 85,89 | 0,36B | 14,02 | 4,08 | 0,53 | 0,47 | 0,50 | 12,94 |
| 9 | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | RC | 57,00 | 85,89 | 0,36B | 14,02 | 4,08 | 0,53 | 0,47 | 0,50 | 12,94 |

Letras minúsculas na coluna comparam amostras com e sem conservante para um mesmo mês pelo teste T. Letras maiúsculas na coluna diferem a amostra com a mesma característica entre os meses pelo teste de Bonferroni. *Umid.: umidade; *SS: sólidos solúveis (°Brix); *Acid.: acidez (g 100 mL⁻¹); *Lip.: lipídios; *Prot.: proteína; *Carb.: carboidratos.

Além da aplicação da radiação gama e da refrigeração, as técnicas utilizadas para produzir o suco de uva e do EHS, embora artesanais, contribuíram para a maioria dos parâmetros avaliados estabilidade dos resultados no decorrer da vida de prateleira. Dessa forma os parâmetros não apresentaram variação significativa tanto para as amostras sem adição de conservantes (R) como para as que tiveram adição do ácido benzóico (RC). Como exceção do teor de cinzas que variou significativamente entre as amostras R e RC no mês inicial e no terceiro mês. Além disso, variaram para as amostras refrigeradas com conservante (RC) entre os três primeiros meses de vida de prateleira (Tabela 12). Morales de la Peña *et al.* (2011) analisaram o perfil mineral de bebida de EHS com suco de fruta e encontraram estabilidade dos mesmos durante o período de estoque.

As amostras mantidas a temperatura ambiente (A e AC) apresentaram resultados maiores de luminosidade quando comparadas as bebidas mantidas sob refrigeração (R e RC), indicando que as amostras que ficaram armazenadas em local com maior temperatura (25 °C) apresentaram tons mais claros que as amostras mantidas em menor temperatura a 4 °C (Figura 20). Segundo Lee *et al.* (2007) as amostras irradiadas a baixas temperaturas ou congeladas apresentaram a reorganização das suas moléculas em função da refrigeração, condição que impede a mobilidade dos radicais livres formados pela radiólise, evitando possíveis alterações químicas. Diferentemente das amostras mantidas na temperatura ambiente que apresentam estrutura química mais vulnerável a radiólise, o que possivelmente induziu a mudança de cor.

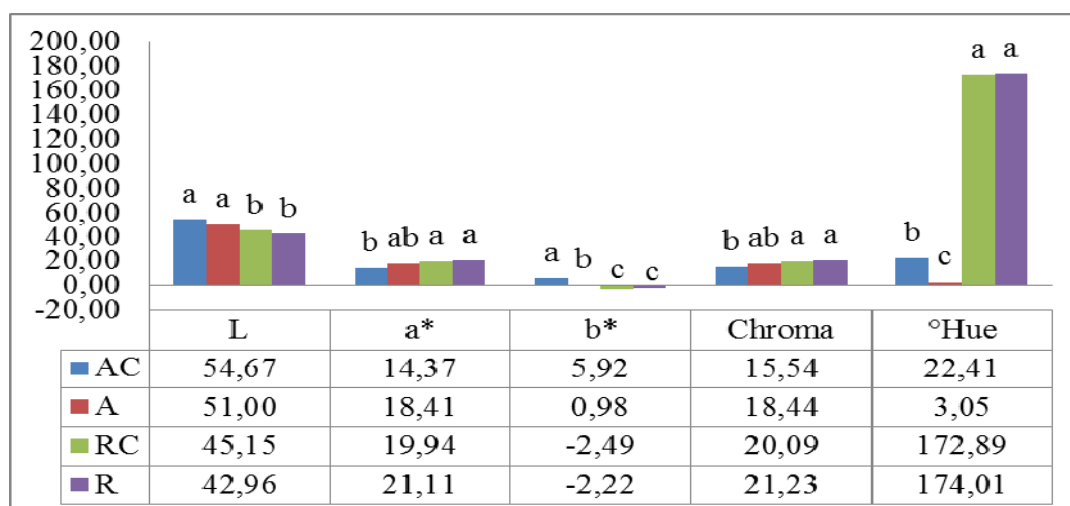


Figura 20. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a*, intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b*, saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática (°Hue) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (coleta de 5 dias após a produção), mantida na temperatura ambiente e com adição de conservante (AC) e sem adição de conservante (A); mantida sob refrigeração com adição de conservante (RC) e sem adição (R). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

Os valores obtidos para o índice a* e b* demonstraram cor vermelha amarelada para as bebidas mantidas na temperatura ambiente sem (A) ou com (AC) adição de conservante e cor vermelha azulada para as bebidas mantidas sob refrigeração, sem (R) ou com (RC) conservante. O índice *chroma* indicou que as amostras A e AC apresentaram menor saturação de cor que as amostras R e RC, ou seja, a bebida mantida na temperatura ambiente ficou com cores mais fracas e opacas (Figura 20). Provavelmente, estas

características foram formadas em função da ação dos radicais livres, oriundos da radiação gama, sobre os carboidratos rompendo suas ligações glicosídicas, desencadeando a reação de Maillard (LEE *et al.*, 2007), bem como sobre as antocianinas presentes no suco, as quais podem sofrer hidrólise glicosídica (LEE *et al.*, 2009) ou até serem degradadas (MOHAJER *et al.*, 2014). Tais alterações induzem a mudança de cor da amostra.

Embora as bebidas mistas tenham recebido a mesma dose de radiação gama (4 kGy), e produzidas com a mesma cultivar de soja (BRS-213) e variedade de uva (Isabel Precoce), a diferença de temperatura em que foram estocadas foi o que contribuiu na variação de tonalidade (°Hue) entre as bebidas mantidas na temperatura ambiente e as refrigeradas, ficando as amostras A e AC com tons vermelhos arroxeados e as amostras R e RC com tons roxos azulados (Figura 20). As alterações de cores foram visualizadas entre os tratamentos (Figura 21).

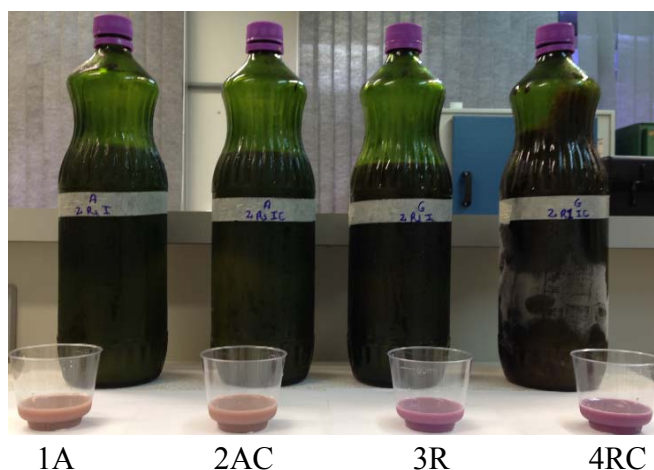


Figura 21. Bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy em copinhos de acrílico, contendo no primeiro da esquerda: (1A) amostra mantida na temperatura ambiente (24°C) e sem conservante; no segundo: (2AC) amostra mantida na temperatura ambiente (24°C) e com conservante ácido benzóico; no terceiro: (3R) amostra refrigerada (4°C) e sem conservante; e no quarto: (4RC) amostra refrigerada (4°C) e com conservante ácido benzóico.

Não se determinou a coloração da bebida refrigerada e sem conservante dos meses 5 e 9, pois essas amostras estavam contaminadas microbiologicamente, constando os resultados da coloração das amostras refrigeradas sem conservante do mês 2, 3 e 7 (Figura 22).

Os resultados positivos para o índice a^* e negativos para o índice b^* indicam que as bebidas armazenadas no mês inicial e no terceiro mês estavam vermelhas

azuladas, por outro lado, as bebidas do segundo e sétimo mês foram caracterizadas pela cor vermelho amarelada, uma vez que o índice b^* foi positivo (Figura 22).

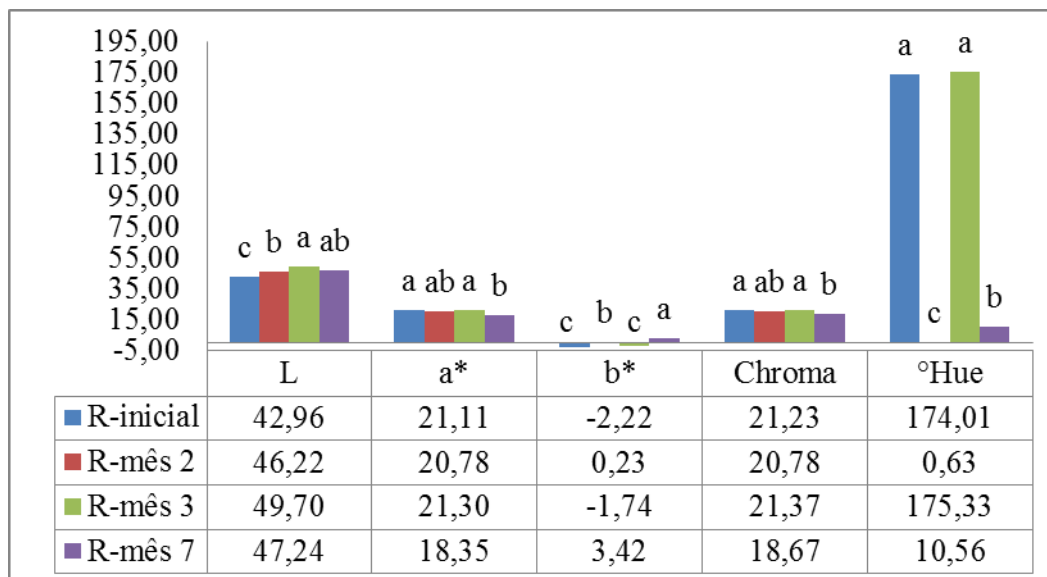


Figura 22. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a^* , intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b^* , saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática ($^{\circ}$ Hue) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro e sétimo mês, mantidas sob refrigeração (4°C) e sem conservante. As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

As amostras mantidas sob refrigeração sem (Figura 22) e com conservante (Figura 23) apresentaram durante a vida de prateleira aumento dos valores da luminosidade, indicando que as bebidas ficaram mais claras. Entretanto, os resultados do índice a^* (Figura 22 e 23) e da saturação de cor (Figura 22 e 24) reduziram, sugerindo que as bebidas tiveram diminuição da intensidade dos tons avermelhados e ficaram com as cores mais fracas e opacas, respectivamente. Essas características se desencadearam, pois segundo Malacrida e Motta (2005), durante o armazenamento pode ocorrer diminuição progressiva das antocianinas monoméricas e formação dos pigmentos poliméricos, acarretando alteração na cor das bebidas mistas.

O método de extração a vapor oferece inúmeras vantagens para se produzir suco de uva, porém não há padronização de água exógena incorporada ao suco (BRESOLIN; GULARTE; MANFROI, 2013), já que a panela extratora permanece aquecida em fogareiro convencional, o que dificulta fixar uma temperatura constante, podendo oscilar

$\pm 5^{\circ}\text{C}$ o aquecimento. Dessa forma, no mesmo lote de suco pode ocorrer variação dos sólidos solúveis, cor, aroma e sabor, pois como os sucos são engarrafados a quente, não há homogeneização da bebida, a fim de evitar contaminação. Por esse motivo os sucos podem ter variação na tonalidade cromática ($^{\circ}\text{Hue}$) e conseqüentemente alterando essa característica na bebida mista, conforme observado para a bebida refrigerada e sem conservante do mês inicial e três (Figura 22) e para a bebida refrigerada e com conservante do mês inicial (Figura 24).

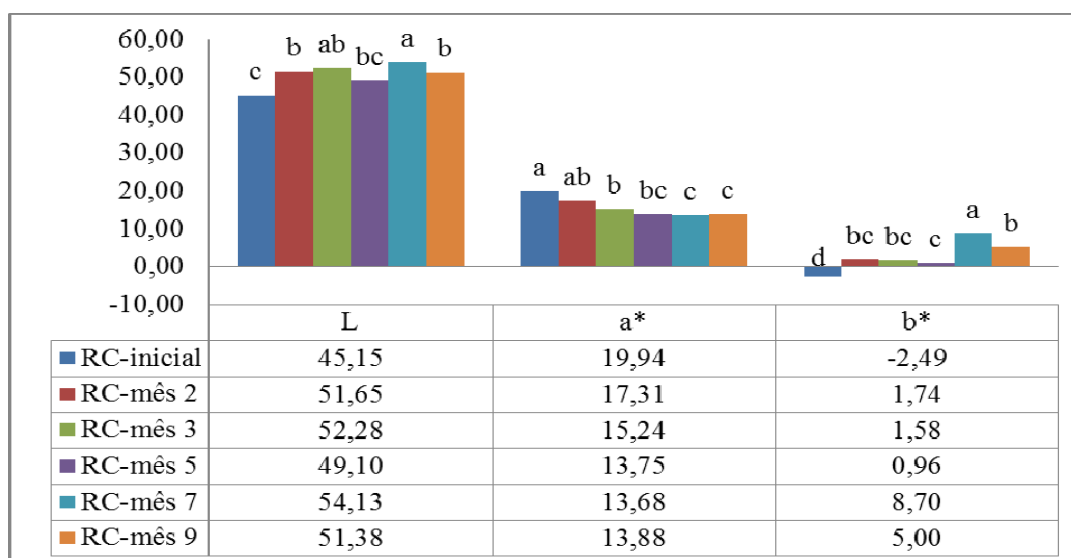


Figura 23. Valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a^* , intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b^* , de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro, quinto, sétimo e nono mês, mantidas sob refrigeração (4°C) e com conservante ácido benzóico (RC). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

As amostras com conservante apresentaram cor vermelha amarelada (índice a^* e b^* positivos) com o passar dos meses de armazenamento (Figura 23), sendo o tom vermelho e amarelo característico do suco de uva e da soja, respectivamente. Já a amostra produzida no mês inicial ficou com a cor vermelha azulada (índice b^* negativo), indicando que o suco presente nessa amostra possivelmente estava com maior teor de antocianinas ou a temperatura de extração do suco contribuiu no aumento das hidroxilas na molécula da antocianina (estrutura -base quinoidal), passando da cor rosa para azul (MALACRIDA; MOTTA, 2006).

Os resultados do $^{\circ}$ Hue indicaram que as bebidas mistas com conservante do segundo, terceiro e quinto mês apresentaram tonalidade cromática vermelha arroxeada, porém, do sétimo e nono mês a tonalidade cromática passou para apenas avermelhada (Figura 24). Situação decorrente da possível degradação das antocianinas devido ao tempo de armazenamento.

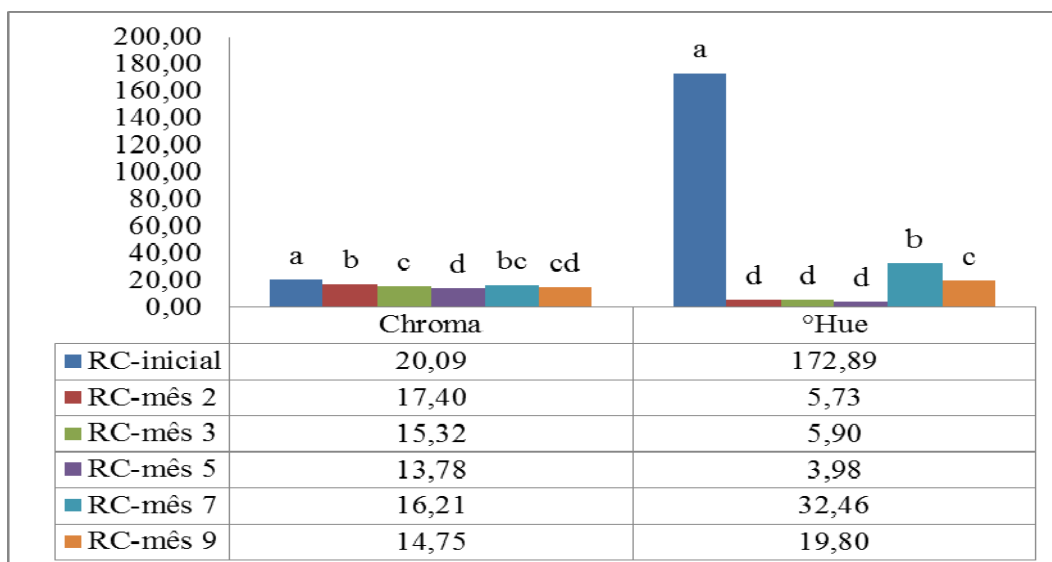


Figura 24. Valores de saturação de cor (Chroma) e tonalidade cromática ($^{\circ}$ Hue) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro, quinto, sétimo e nono mês, mantidas sob refrigeração (4 $^{\circ}$ C) e com conservante ácido benzóico (RC). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

Segundo Castilhos *et al.* (2015) as antocianinas ao reagirem com metabólitos de leveduras sofrem modificações, induzindo mudança de cor (escurecimento) em vinhos. Entretanto, mesmo havendo diferença entre os resultados de luminosidade das amostras com adição de conservante com as amostras sem adição de conservante (Figura 25), o motivo provavelmente não seja pela maior presença de bolores e leveduras nas bebidas sem adição de conservante, pois as mesmas estavam sob refrigeração, cuja a temperatura dificulta o metabolismo da maioria dos microrganismos. Além disso, essas amostras não apresentavam características (sabor, cor ou aroma) de produto degradado.

Os resultados de luminosidade, durante a vida de prateleira, indicaram que as bebidas mistas com conservante demonstraram-se mais claras que as bebidas sem adição de conservante. Da mesma maneira, a intensidade dos tons avermelhados

(índice a* positivo) das amostras com conservante foi menor que das amostras sem conservante. Os tons azulados (índice b* negativo) presentes nas amostras sem conservante do mês inicial e do terceiro mês destoaram dos resultados indicados pelo restante das bebidas, que foram tons amarelados (índice b* positivo) nos sete meses de armazenamento (Figura 25).

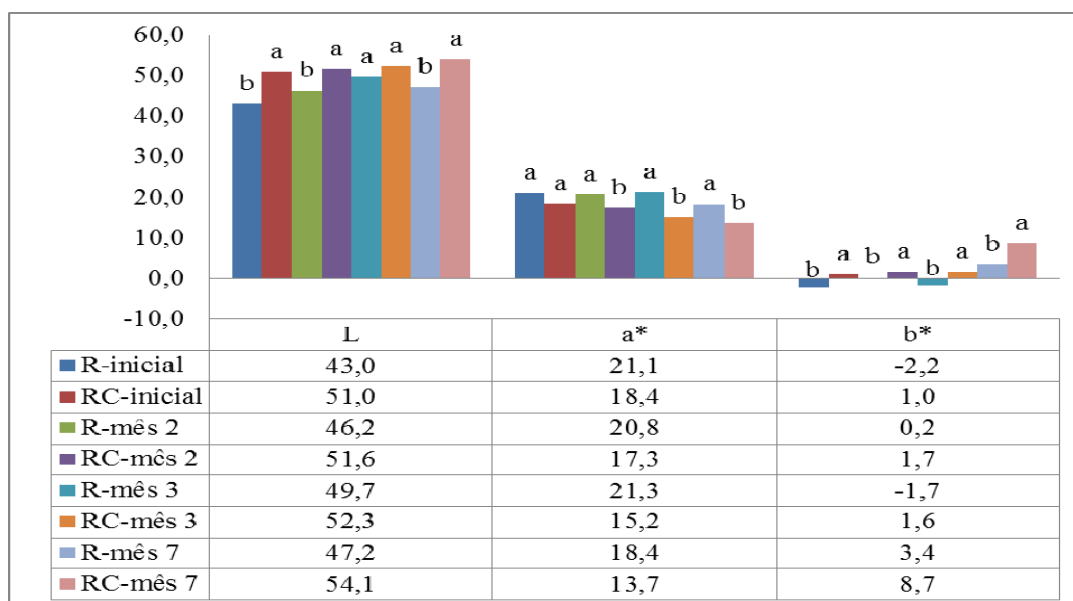


Figura 25. Comparação dos valores de luminosidade (L), intensidade de vermelho (+) ou verde (-) representado pelo índice a* e intensidade de amarelo (+) ou azul (-) representado pelo índice b* de bebidas mistas de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy refrigeradas (4 °C), sem (R) e com (RC) conservante ácido benzóico do mês inicial (5 dias após a produção); do segundo; terceiro e sétimo mês. As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados a partir da comparação múltipla pelo teste de Bonferroni.

As bebidas mistas (com e sem conservante) apresentaram resultados menores para luminosidade e maiores para intensidade de vermelho (índice a* positivo) (Figura 25) quando comparados aos valores obtidos por Nunes *et al.* (2014), o qual analisou a cor de bebida de soja sabor iogurte com polpa de morango, encontrando o resultado de 65,18 para a luminosidade e de 5,95 para o índice a*. Essa diferença entre os resultados ocorrem comumente entre as bebidas, pela diversidade de frutos que podem ser misturados aos extratos de soja, pela técnica empregada na produção das bebidas e pela proporção usada de EHS e suco.

b) Análise bioquímica

Independente da temperatura em que as bebidas ficaram estocadas e da adição do conservante, os compostos fenólicos, os flavonoides e a capacidade antioxidante mantiveram-se constantes, não havendo diferença significativa entre os resultados dos tratamentos (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados médios seguidos de desvio padrão dos componentes bioquímicos (compostos fenólicos- mg mL⁻¹; flavonóides- mg mL⁻¹; e capacidade antioxidante- μmol mL amostra⁻¹) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida em temperatura ambiente (24°C) e sob refrigeração (4°C), sem adição de conservante (A e R) e com adição de conservante ácido benzóico (AC e RC).

| Determinações | A | R | AC | RC |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Compostos fenólicos | 0,69±0,05 | 0,73±0,03 | 0,69±0,04 | 0,74±0,04 |
| Flavonóides | 0,39±0,09 | 0,39±0,05 | 0,46±0,06 | 0,42±0,03 |
| Capacidade antioxidante | 0,48±0,02 | 0,46±0,01 | 0,46±0,04 | 0,40±0,07 |

*Ausência de letras: diferença não significativa entre os tratamentos pelo teste T.

Os resultados obtidos nesse experimento (Tabela 13 e 14) quando comparados aos divulgados por Callou *et al.* (2010) foram superiores para o teor dos compostos fenólicos (0,18 mg mL⁻¹) e similares para a capacidade antioxidante (0,49 μmol mL amostra⁻¹) em bebida mista de soja com suco de uva, com a soja estocada a 6 meses. Por outro lado, os resultados para o teor dos compostos fenólicos (Tabela 13 e 14) foram inferiores aos encontrados para bebida mista de soja com suco de frutas tropicais (0,92 a 1,89 mg mL⁻¹) (ABREU *et al.*, 2007). Da mesma forma, os resultados para flavonoides (Tabela 13 e 14) foram menores aos da bebida mista de soja com suco de frutas (0,84 a 1,69 mg mL⁻¹) mantidas sob refrigeração (4 °C) por 56 dias (MORALES-DE PEÑA *et al.*, 2011).

A capacidade antioxidante manteve-se constante significativamente até os nove meses da vida de prateleira (Tabela 14). Morales-de La Peña *et al.* (2010) ao analisarem bebida mista de soja com suco de frutas observaram redução gradativa da capacidade antioxidante em 60 dias de estoque. Em geral, os resultados desse trabalho podem variar com os relatos encontrados na literatura de acordo com a matriz alimentar utilizada, o tratamento aplicado e as condições do processo.

Os flavonóides e a capacidade antioxidante das bebidas mantidas sob refrigeração sem (R) e com (RC) conservante não apresentaram alteração significativa no período da vida de prateleira, porém as bebidas R (26 %) e RC (50 %) demonstraram redução significativa dos compostos fenólicos no terceiro mês de estocagem (Tabela 14). Como essa diferença do teor foi pontual, atingindo apenas o lote do terceiro mês, atribuiu-se essa alteração a radiação gama, embora todas as bebidas tenham sido submetidas à mesma dose.

Tabela 14. Valores médios seguidos de desvio padrão dos componentes bioquímicos (compostos fenólicos- mg mL⁻¹; flavonóides- mg mL⁻¹; e capacidade antioxidante- μmol mL amostra⁻¹) de bebida mista a base de EHS com suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração (4°C), sem (R) e com (RC) conservante ácido benzóico no prazo de nove meses.

| Meses | Amostras | Determinações | | |
|---------|----------|---------------------|-------------|-------------------------|
| | | Compostos fenólicos | Flavonóides | Capacidade antioxidante |
| Inicial | R | 0,73±0,03 ab | 0,39±0,05 | 0,46±0,01 |
| | RC | 0,74±0,04 A | 0,42±0,03 | 0,40±0,07 |
| 2 | R | 0,74±0,06 a | 0,34±0,05 | 0,46±0,03 |
| | RC | 0,71±0,08 A | 0,36±0,11 | 0,48±0,03 |
| 3 | R | 0,54±0,08 c | 0,34±0,05 | 0,47±0,02 |
| | RC | 0,37±0,13 B | 0,21±0,09 | 0,39±0,07 |
| 5 | R | * | * | * |
| | RC | 0,64±0,11 A | 0,26±0,08 | 0,47±0,01 |
| 7 | R | 0,64±0,03 abc | 0,39±0,03 | 0,47±0,02 |
| | RC | 0,62±0,06 AB | 0,42±0,02 | 0,47±0,01 |
| 9 | R | * | * | * |
| | RC | 0,60±0,05 AB | 0,35±0,03 | 0,31±0,01 |

Letras minúsculas na coluna comparam as amostras mantidas sob refrigeração (R) no decorrer dos meses. Letras maiúsculas na coluna comparam as amostras mantidas sob refrigeração com conservante (RC) no decorrer dos meses. (*) análise não realizada.

Os flavonoides são os compostos fenólicos abundantes na soja (isoflavonas) e no suco de uva (antocianinas), aos quais se atribuem grande parte da capacidade antioxidante da amostra (DIXIT *et al.*, 2010; GRANATO *et al.*, 2015; POPOVIT *et al.*, 2013) e os mesmos demonstraram-se estáveis durante o tempo de armazenamento (Tabela 14), fato que caracteriza essa bebida mista como funcional até os nove meses em que foi observada (BRASIL, 2008).

Ao comparar o teor dos compostos fenólicos da bebida mista inicial (RC) com teor da bebida (RC) armazenada a 9 meses observou-se redução do mesmo em 23,3 %, sendo que 20 % dessa redução foi representada pelos flavonoides (isoflavonas e antocianinas), o que contribuiu com a queda da capacidade antioxidante em 29 %, embora essa diferença não tenha sido significativa (Tabela 14).

c) Análise microbiológica

A legislação vigente (BRASIL, 2001b) para limites microbiológicos em bebidas não alcoólicas exige que seja realizada apenas a análise de coliformes termotolerantes (45 °C) e *Salmonella* sp, os quais mantiveram-se ausentes nas bebidas mistas avaliadas (Tabela 15). Assim, todas as demais análises microbiológicas (bolos e leveduras, coliformes totais, bactérias mesófilas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) realizadas nesse experimento poderiam ser desconsideradas de acordo com a lei brasileira. Porém tais microrganismos apresentam importância fitossanitária, motivo relevante que contribuiu para execução dessas análises.

As bebidas mistas de EHS e suco de uva submetidas a 4 kGy de radiação gama, no decorrer da vida de prateleira, apresentaram ausência do crescimento de *Salmonella* sp, *Bacillus cereus*, coliformes fecais e termotolerantes. Todavia, os bolos e leveduras demonstraram resistência a essa dose de radiação gama, pois se mantiveram presentes em todas as amostras (A; AC e R; RC) a partir do primeiro mês de processamento da bebida mista até no nono mês de armazenamento. O mesmo foi confirmado por Urbain (1986), o qual declarou que os fungos apresentam baixa susceptibilidade à radiação quando comparados com algumas bactérias não formadoras de esporos, sendo as doses letais para os fungos filamentosos por volta de 2,5 a 6,0 kGy e para as leveduras de 4,65 a 20 kGy. Entretanto, para os sucos de frutas essas doses podem ser muito elevadas, causando alterações indesejáveis principalmente para o atributo sabor (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Alighourchi, Barzegar e Abbasi (2008) concluíram que em sucos de romã, mantidos sob refrigeração por 14 dias, doses acima de 2 kGy podem eliminar os microrganismos, bem como retardar o crescimento dos mesmos. Tal resultado concordou com os desse trabalho somente para as bebidas mantidas sob refrigeração no tempo inicial, pois a partir do primeiro mês a dose de 4 kGy e a adição do conservante não impediram o

crescimento dos bolores e leveduras (Tabela 15). Sendo no mês inicial e segundo mês houve a presença exclusiva das leveduras nas bebidas. A partir do segundo mês, além das leveduras apareceram os fungos filamentosos, os quais continham em sua parede celular presença de melanina (hifas com coloração escura), característica que os tornam mais resistentes às elevadas temperaturas (pasteurização) e a radiação gama (OLIVEIRA *et al.*, 2007; VARO *et al.*, 2007).

Tabela 15. Contagem microbiológica em bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração (4°C) ou temperatura ambiente (24 °C), e sem ou com adição de conservante ácido benzóico por um período de nove meses.

| Meses | Amostras | Microrganismos | | |
|---------|----------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| | | <i>Staphylococcus aureus</i> | Bolores e leveduras | Bactérias mesófilas |
| Inicial | R* | <10 | <10 | <10 |
| | RC** | <10 | <10 | <10 |
| | A* | <10 | 3×10^2 | <10 |
| | AC** | <10 | <10 | <10 |
| 2 | R | <10 | $4,2 \times 10^5$ | <10 |
| | RC | <10 | $3,5 \times 10^4$ | <10 |
| | A | <10 | $4,9 \times 10^4$ | <10 |
| | AC | <10 | <100 | 1×10^1 |
| 3 | R | <10 | $4,0 \times 10^4$ | <10 |
| | RC | <10 | $1,0 \times 10^2$ | <10 |
| | A | <10 | <100 | 1×10^2 |
| | AC | <10 | $4,0 \times 10^3$ | <10 |
| 5 | R | $4,4 \times 10^3$ | $6,5 \times 10^4$ | <10 |
| | RC | <10 | 1×10^2 | <10 |
| 7 | R | <10 | $1,1 \times 10^3$ | <10 |
| | RC | <10 | $1,2 \times 10^5$ | <10 |
| 9 | R | <10 | $2,3 \times 10^4$ | 1×10^1 |
| | RC | 0 | $1,1 \times 10^4$ | 0 |

* R e A = sigla para as bebidas que ficaram sob refrigeração e a temperatura ambiente, respectivamente.** RC e AC= sigla para as bebidas que ficaram sob refrigeração e temperatura ambiente, e com adição de conservante. A unidade dos resultados é UFC (unidades formadoras de colônia).

As amostras mantidas em temperatura ambiente após um mês de estoque foram decompostas pelos microrganismos presentes (bactérias mesófilas, bolores e leveduras), de modo que a temperatura de 25 °C aliada à elevada porcentagem de umidade e a qualidade nutritiva contribuíram com a produção dos metabólitos deteriorantes pelos mesmos, apresentando as bebidas mistas A e AC, tanto do segundo como do terceiro mês,

aparência distinta das demais e sabor e aroma desagradáveis. Diferentemente das amostras mantidas sob refrigeração, que mesmo apresentando contagem microbiológica (Tabela 15), a temperatura de 4 °C dificultou a produção dos metabólitos deteriorantes, permanecendo inalteradas as características organolépticas das bebidas mistas R e RC. Dessa forma, interrompeu-se as análises microbiológicas das demais amostras mantidas em temperatura ambiente (tratamentos descartados), dada a constância de deterioração observada do segundo ao terceiro mês de armazenamento, não sendo uma contaminação de apenas um lote (Tabela 15).

Houve pouca incidência bacteriana nas amostras, o que já era esperado pela dose de radiação aplicada (4 kGy) e pH baixo das bebidas (4,5), fato que restringe o crescimento das mesmas. Porém, quando a microbiota bacteriana se fez presente, as amostras sem adição de conservante do quinto e nono mês de armazenamento foram degradadas, mesmo na temperatura de 4 °C. Tal condição se consolida, pois o metabolismo das bactérias é mais rápido do que dos fungos, justificando a bebida manter-se estável quanto à qualidade organoléptica mesmo ocorrendo a contagem fúngica nas amostras.

Em todas as amostras refrigeradas com adição de conservante não houve crescimento bacteriano, demonstrando a eficiência do ácido benzoico em impedir o crescimento desses microrganismos. Além disso, associar duas técnicas de conservação (refrigeração e radiação gama) mostrou-se capaz em preservar a bebida mista sem deteriorar até o nono mês da vida de prateleira. O mesmo foi confirmado por Oliveira *et al.* (2007) o qual pasteurizou e irradiou caldo de cana e por Chiebao (2008) que irradiou e refrigerou, em ambas as situações obtiveram grande redução microbiológica.

d) Análise sensorial

Independente da temperatura em que ficaram mantidas as amostras das bebidas mistas, a adição do conservante ácido benzóico não interferiu significativamente na sua qualidade organoléptica. Da mesma maneira, os resultados foram similares para todos os atributos ao comparar as amostras mantidas na temperatura ambiente (A e AC) com as refrigeradas (R e RC), com exceção do atributo aparência que apresentou diferença estatística (Tabela 16). Provavelmente os provadores notaram as possíveis alterações induzidas pela radiação gama sobre as antocianinas nas bebidas mistas

mantidas na temperatura ambiente, nas quais os radicais livres (responsáveis pelas mudanças moleculares) possuem maior mobilidade que nas amostras refrigeradas (LEE *et al.*, 2007). Tais alterações ocorridas no atributo aparência não tiveram boa aceitação pela maioria dos provadores, pois as notas ficaram acima de 7 (gostei regularmente) para as bebidas refrigeradas e acima de 6 (gostei ligeiramente) para as bebidas mantidas na temperatura ambiente.

Todas as amostras tiveram adição de goma acácia e agar, pois além de conferir estabilidade dos nutrientes, aumenta a consistência (viscosidade) da bebida, características associadas a melhor aceitação segundo NUNES *et al.* (2014). Os autores observaram que ao aumentarem a temperatura (5 para 10 °C) de armazenamento, obtiveram redução da viscosidade de bebida de soja, decaindo as notas da avaliação global da bebida. Entretanto, o atributo sabor e avaliação global apresentaram a mediana das notas da escala hedônica em 6, demonstrando que muitos provadores gostaram entre ligeiramente a muitíssimo tanto da bebida mista mantida na temperatura ambiente quanto da mantida sob refrigeração e ambas com ou sem conservante. Isto caracteriza que se houve mudança na viscosidade essa não interferiu na qualidade sensorial da bebida (Tabela 16).

Tabela 16. Mediana das notas dos atributos (escala e intensidade) de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantidas em temperatura ambiente (A) e sob refrigeração (R), e com adição de conservante (AC e RC).

| Tipo | Tratamentos | Atributos | | | |
|-----------------------|-------------|-----------|-------|-------|-----------------|
| | | Aparência | Aroma | Sabor | Avaliação Geral |
| Escala Hedônica | A | 6AC | 7 | 6 | 6 |
| | AC | 6A | 6 | 6 | 6 |
| | R | 7BC | 6 | 6 | 6 |
| | RC | 7C | 6 | 6 | 6 |
| Escala da Intensidade | A | -1A | -1a | -1 | -1 |
| | AC | -1A | -1b | -1 | -1 |
| | R | 0aBC | 0 | 0 | 0a |
| | RC | 0bC | -1 | 0 | 0b |

Considera-se um nível de significância de 0,05. Letras minúsculas comparam as amostras mantidas sob mesma temperatura, sem ou com conservante ácido benzóico para cada tipo de nota pelo teste de Wilcoxon, como da escala hedônica (1 a 9) e da intensidade (-2 a 2). Letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre todas as amostras (A; AC; R e RC) de cada tipo de nota pelo teste de Friedmann. Início da vida de prateleira, análise sensorial realizada após cinco dias da produção da bebida.

Os resultados medianos obtidos pela escala da intensidade demonstraram que muitos provadores acharam todos os atributos da bebida mista mantida em temperatura ambiente um pouco menos intenso do que gostariam. Já para a bebida mista refrigerada parte considerável dos provadores gostou da intensidade dos atributos conferidos a ela. Apenas o atributo aparência obteve diferença significativa na intensidade do gostar dos provadores entre as bebidas mantidas na temperatura ambiente com as refrigeradas.

A adição do conservante (ácido benzoico) na bebida mista mantida em temperatura ambiente interferiu significativamente na intensidade de gostar dos provadores somente para o atributo aroma. Entretanto, a adição do conservante diferiu a opinião dos provadores quanto à intensidade de gostar do atributo aparência e avaliação global da bebida mista refrigerada (Tabela 16).

As amostras refrigeradas sem adição de conservante tiveram o lote do quinto e do nono mês contaminados microbiologicamente, o que causou a degradação das bebidas mistas, motivo que impediu a análise sensorial das mesmas nas devidas épocas. Dessa forma, justifica-se a ausência dos resultados da análise de aceitação pelo teste da escala hedônica desses referidos períodos na Figura 26.

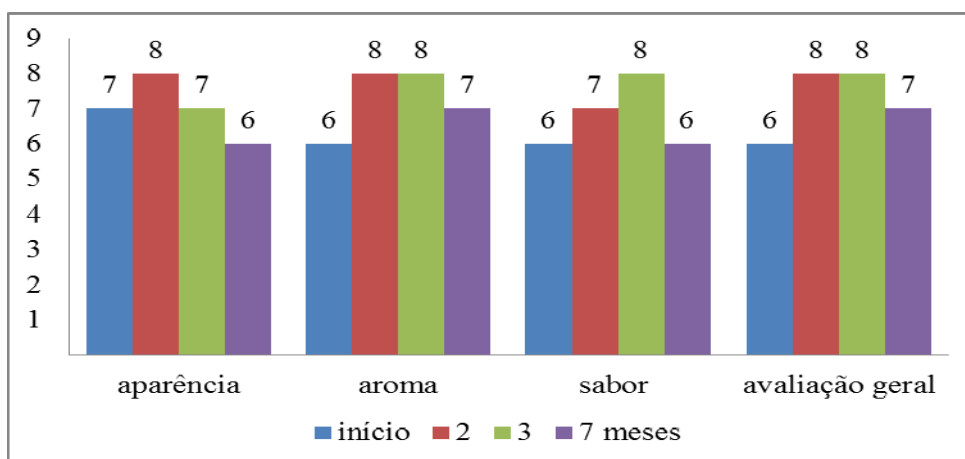


Figura 26. Mediana das notas dos atributos de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantidas sob refrigeração (4°C) e sem conservante durante 7 meses. Ausência de letras representa que não houve diferença significativa entre os meses de vida de prateleira para os atributos avaliados a partir do teste de Friedmann.

A mediana das notas não reduziu para todos os atributos avaliados no decorrer da vida de prateleira, apenas o atributo aparência apresentou a mediana menor no sétimo mês em relação ao mês inicial da produção da bebida mista refrigerada e sem

adição de conservante (Figura 26). Fato que seja correspondente à redução progressiva das antocianinas monoméricas e formação dos pigmentos poliméricos, condições que implicam na alteração da cor das bebidas durante o armazenamento (MALACRIDA; MOTTA, 2005). Fenômeno que pode ter sido observado pelos provadores.

A mediana da nota do atributo avaliação geral ficou em torno de 7, indicando que 50 % dos provadores gostaram entre regularmente a muitíssimo da bebida mista refrigerada com adição ou não de conservante (Figura 26 e 27). Este resultado demonstra maior aceitabilidade da bebida com adição de suco de uva em EHS, pois ao comparar individualmente as notas da avaliação global do EHS e do suco de uva, as mesmas foram menores que da bebida mista, sendo 5 (gostaram de maneira indiferente) e 6 (gostaram ligeiramente), respectivamente. Resultado que concorda com BEHRENS e SILVA (2004), os quais relataram aumento do consumo de bebidas mistas desde quando foram inseridas ao mercado (década de 90), indicando que a população foi receptiva a esse tipo de bebida e incorporou-a a seus hábitos alimentares.

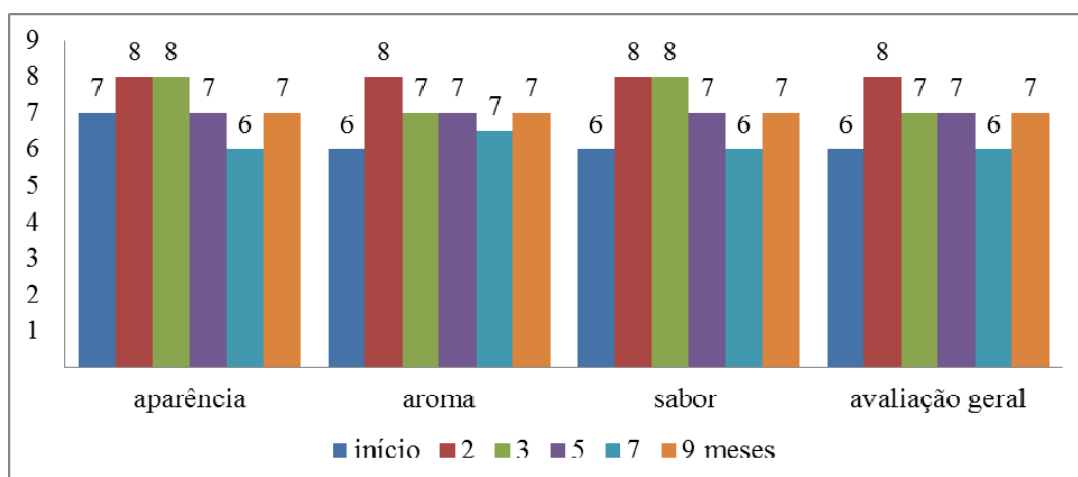


Figura 27. Mediana das notas dos atributos de bebida mista a base de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantidas sob refrigeração (4 °C) e com conservante ácido benzóico durante 9 meses. Ausência de letras representa que não houve diferença significativa entre os meses de vida de prateleira para os atributos avaliados a partir do teste de Friedmann.

As bebidas mantidas sob refrigeração sem (Figura 26) e com conservante (Figura 27) apresentaram no segundo mês a mediana da nota da escala hedônica em torno de 8 para o atributo sabor, indicando que 50% dos provadores gostaram muito a muitíssimo da bebida. Contudo, Silva, Prudêncio e Felberg (2007) encontraram que 50% dos entrevistados tinham o hábito de consumir bebida de soja indicando mudança no hábito alimentar da população ocidental, a qual apresentava histórico de alta restrição

ao consumo de produtos a base de soja. Em geral, os resultados obtidos (Figura 26 e 27) demonstraram estabilidade sensorial significativa no decorrer da vida de prateleira para todos os atributos avaliados.

Segundo Lesschaeve e Noble (2005) a presença dos compostos fenólicos é responsável pelo sabor adstringente e amargo, características descritas como desagradáveis quando presentes em bebidas e comumente presentes em produtos a base de soja e sucos de frutas. Entretanto, mesmo havendo redução dos compostos fenólicos (Tabela 14) na bebida mista do segundo mês de vida de prateleira, e conseqüente redução dessas características, as mesmas não foram notadas ao paladar dos provadores, já que não houve aumento das notas e nem diferiu significativamente do resultado mediano dos demais meses (Figura 27) que continham maior teor de compostos fenólicos.

As amostras (R e RC) apresentaram os resultados medianos dos atributos em 6 e 7 para todos os meses de análise sensorial, indicando, respectivamente, que 50% dos provadores gostaram ligeiramente e regularmente a muitíssimos das bebidas mistas de EHS e suco de uva com ou sem conservante. Além disso, a adição do conservante foi imperceptível pelos provadores no mês inicial da produção da bebida e no segundo mês, não alterando a qualidade organoléptica da bebida ao compará-la com a amostra sem conservante, pois os resultados mantiveram-se similares significativamente para todos os atributos. Entretanto, a partir do terceiro mês houve diferença significativa entre os resultados das amostras com e sem conservante para o atributo aparência e sabor e no sétimo mês para o atributo sabor e avaliação global (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação dos atributos entre a bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida sob refrigeração (4 °C) sem (R) e com (RC) conservante ácido benzóico para cada mês (inicial, 2, 3 e 7). Valores expressos em medianas das notas.

| Meses | Amostras | Aparência | Aroma | Sabor | Avaliação global |
|---------|----------|-----------|-------|-------|------------------|
| Inicial | R | 7,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 |
| | RC | 7,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 |
| 2 | R | 7,0 | 6,0 | 7,0 | 7,0 |
| | RC | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| 3 | R | 6,0 a | 7,0 | 7,0 a | 7,0 |
| | RC | 7,0 b | 7,0 | 6,0 b | 7,0 |
| 7 | R | 6,0 | 7,0 | 6,0 a | 7,0 a |
| | RC | 6,0 | 6,5 | 6,0 b | 6,0 b |

Considera-se um nível de significância de 0,05. Letras minúsculas, na coluna, comparam as amostras de cada mês pelo teste de Wilcoxon.

A mediana das notas da escala da intensidade ficou em torno de -1 para a maioria dos atributos avaliados da bebida mista mantida na temperatura ambiente, demonstrando que os provadores (50 %) acharam as características dessas bebidas um pouco a muito menos intensa do que gostariam. Já para as amostras mantidas sob refrigeração com e sem conservante, a intensidade estava da maneira que gostavam em todos os atributos, independente dos meses avaliados. Com exceção do atributo aparência a partir do segundo mês que ficou com a mediana da nota em torno de -1 (menos intenso do que gostavam) para a maioria dos meses avaliados, em ambas as bebida (com e sem conservante) (Tabela 18).

Tabela 18. Mediana das notas do teste de intensidade de bebida mista de EHS e suco de uva irradiada a 4 kGy, mantida na temperatura ambiente (A- 24 °C) e sob refrigeração (R- 4 °C) e com conservante ácido benzóico (AC e RC), para cada atributo.

| Meses | Amostras | Atributos | | | |
|---------|----------|-----------|--------|-------|------------------|
| | | Aparência | Aroma | Sabor | Avaliação global |
| Inicial | A | -1,0 | 0,0 a | 0,0 | -1,0 |
| | AC | -1,0 | -1,0 b | -1,0 | -1,0 |
| | R | 0,0 a | 0,0 | 0,0 | 0,0 a |
| | RC | 0,0 b | 0,0 | 0,0 | 0,0 b |
| 2 | R | 0,0 a | 0,0 a | 0,0 a | 0,0 a |
| | RC | -1,0 b | 0,0 b | 0,0 b | 0,0 b |
| 3 | R | -1,0 a | 0,0 | 0,0 a | 0,0 |
| | RC | 0,0 b | 0,0 | 0,0 b | 0,0 |
| 5 | R | . | . | . | . |
| | RC | -1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7 | R | -1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | RC | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 9 | R | . | . | . | . |
| | RC | -1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Considera-se um nível de significância de 0,05. Letras minúsculas, na coluna, comparam significativamente as amostras de cada mês pelo teste de Wilcoxon. *conforme o teste sensorial o significado de -1: um pouco menos intenso que o desejável; e 0: intenso conforme desejável.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Experimento 1

As diferentes doses de radiação gama foram capazes de elevar o teor dos compostos fenólicos dos cultivares BRS-213 e BRS-258, e a atividade da SOD do cultivar BRS-213. Toda via, os flavonóides, a capacidade antioxidante, a atividade da PPO e POD permaneceram estáveis para os três cultivares de soja.

Experimento 2

O método de extração (quente ou frio) influenciou nos resultados da composição físico-química, da cor, dos componentes bioquímicos e da análise sensorial entre os EHS.

Dentre os aditivos adicionados, apenas o EHS produzido pelo método de extração a quente obteve aumento significativo da capacidade antioxidante ao adoçá-lo com suco concentrado de maçã.

Embora o método de extração a frio do EHS tenha contribuído com maiores teores de proteína, lipídios, e compostos fenólicos, o EHS do método de extração a quente obteve melhores resultados na análise sensorial e o restante dos parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa. Dessa forma, o método extração a quente foi selecionado para produzir o EHS nos próximos experimentos.

Experimento 3

Etapa 1

A radiação gama induziu poucas alterações físico-químicas no EHS, ficando como destaque apenas a redução do teor proteico (deaminação) e a variação na cor das amostras ao elevar a dose.

Somente o EHS submetido à dose de 8 kGy apresentou redução significativa dos compostos fenólicos. Os flavonóides e a capacidade antioxidante dos EHS mantiveram-se estáveis independentemente da dose de radiação gama aplicada. Houve ausência microbiológica em todos os tratamentos realizados para os EHS (0, 2, 4 e 8 kGy).

A dose de 8 kGy alterou o sabor do EHS, já os EHS submetidos as doses de 2 e 4 kGy não apresentaram diferença significativa do seu controle para todos os atributos avaliados. Sendo selecionada a dose de 4 kGy como a mais adequada para o EHS, a qual contribuiu com a qualidade fitossanitária e com a estabilidade nutritiva e organoléptica.

Etapa 2

As variações significativas ocorridas na composição físico-química foram decorrentes do método de extração do suco de uva (panela extratora a vapor). Entretanto, todos os parâmetros observados ficaram adequados aos limites estabelecidos pela legislação vigente.

Elevar a dose de radiação gama permitiu aumento da acidez titulável e variação na cor dos sucos de uva tinta. Somente a dose de 4 kGy induziu o aumento dos compostos fenólicos. A capacidade antioxidante e os flavonóides não tiveram alteração dos seus resultados ao elevar a dose de radiação gama.

A partir da dose de 2 kGy eliminou-se os bolores e leveduras presentes no suco de uva controle. Os provadores observaram alterações nos atributos sensoriais nos sucos submetidos a 2, 4 e 8 kGy, porém, apenas a dose de 8 kGy comprometeu a qualidade organoléptica do suco de uva. Dessa forma, selecionou-se a dose de 4 kGy para essa amostra.

Experimento 4

A bebida mista de EHS com suco de uva submetida à radiação gama (4 kGy) e mantida na temperatura ambiente se degradou microbiologicamente após 1 mês de vida de prateleira, independentemente da adição de conservante, porém antes disso os parâmetros físico-químicos e os atributos sensoriais mantiveram-se inalterados.

Manter a amostra irradiada em temperaturas diferentes (4 e 25 °C) induziu a variação da tonalidade e saturação das mesmas.

A radiação gama associada à refrigeração foi eficiente na preservação da maioria dos parâmetros físico-químicos, bioquímicos e dos atributos sensoriais, conservando de 5 a 7 meses a bebida mista sem adição de conservante e 9 meses a amostra com adição de conservante.

Ao longo da vida de prateleira, mesmo havendo contagem microbiológica, a temperatura de refrigeração impediu a produção dos metabólitos deteriorantes, permanecendo estáveis as características organolépticas das bebidas mistas.

A adição de conservante foi significativamente imperceptível aos provadores na amostra mantida em temperatura ambiente. Enquanto que na bebida mista refrigerada com conservante, no quinto e sétimo mês de estocagem, recebeu para o atributo sabor menores notas da escala hedônica, indicando percepção do conservante pelos provadores.

Além dos provadores aprovarem a intensidade da maioria dos atributos avaliados, os mesmo gostaram entre ligeiramente a muitíssimo das bebidas mista durante o período de armazenamento.

8-CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado esse trabalho, pode-se concluir que a técnica radiação gama na dose de 4 kGy foi adequada quando associada a refrigeração (4 °C) e adição de conservante ácido benzóico para manter estáveis as características fitossanitárias, nutricionais e sensoriais da bebida mista de soja e suco de uva por 9 meses.

Somente o uso de radiação gama (4 kGy) em bebida mista de EHS e suco de uva não demonstrou-se eficiente, uma vez que as amostras mantidas na temperatura ambiente foram deterioradas no primeiro mês de vida de prateleira, independente da adição do conservante ácido benzóico. No entanto, ao refrigerar (4 °C) as bebidas mistas irradiadas a 4 kGy, sem adição de conservante, as mesmas apresentaram validade de até 7 meses e com adição do conservante ácido benzóico de até 9 meses.

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 14141: Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas*. Rio de Janeiro, 1998
- ABREU, C. R. A. *et al.* Avaliação química e físico-química de bebidas de soja com frutas tropicais. *Alimentos e nutrição*, v. 18, n. 3, p. 291–296, 2007.
- ACEDO-CARRILLO, J.I. *et al.* Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum. *Carbohydrate Polymers* 65, 327- 336, 2006.
- ACHOURI, A.; BOYE, J. I.; ZAMANI, Y. Soybean variety and storage effects on soymilk flavour and quality. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 43, n. 1, p. 82–90, jan. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2006.01393.x>>. Acesso em: 15 maio 2013.
- ALIGHOURCHI, H.; BARZEGAR, M.; ABBASI, S. Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of various pomegranate juices. *Food Chemistry*, v. 110, n. 4, p. 1036–1040, 2008.
- ALIKAMANOGLU, S.; YAYCILI, O.; SEN, A. Effect of gamma radiation on growth factors, biochemical parameters, and accumulation of trace elements in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill). *Biological Trace Element Research*, v. 141, n. 1-3, p. 283–293, 2011.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PENTEADO, M. V. C., *Vigilância Sanitária. Tópicos sobre legislação e análise de alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 203. 2007.
- ANDRÉS, V.; TENORIO, M. D.; VILLANUEVA, M. J. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. *Food chemistry*, v. 173, p. 1100–6, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614017105>>.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2014. 135 p. Disponível em: <http://www.grupogaz.com.br/editora/anuarios/show/4333.html>. Acesso em: 05 mai 2015.

ARAÚJO, J.M.A. *Química de Alimentos: teoria e prática*. 3. Ed. Viçosa: UFV, 2004. 478 p.

ARJEH, E.; BARZEGAR, M.; ALI SAHARI, M. Effects of gamma irradiation on physicochemical properties, antioxidant and microbial activities of sour cherry juice. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 114, p. 18–24, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X15001851>>.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from Soybeans. *Methods in Enzymology*, v. 71, p. 441–451, 1981.

BARBOSA, A. *et al.* Isoflavone content and profile and antioxidant activity of soy and soy products. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 921–926, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000400032&script=sci_arttext>.

BARROS, E. A. DE. *Estudo de lipoxigenases em extrato hidrossolúvel de soja (Glycine max (L.) Merr.) submetidos a diferentes tratamentos*. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2012.

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

BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H.; VARÉA, G. S. Cultivares de soja e produção de tofu. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 555-565, out./dez. 2012

BERTOLIN, T. E. *et al.* Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, n. 04, p. 301–307, 2011. Disponível em: <<http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v14n4472a.pdf>>.

BHAT, R.; SRIDHAR, K. R.; TOMITA-YOKOTANI, K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). *Food Chemistry*, v. 103, n. 3, p. 860–866, 2007.

BOATTO, D. A. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo petit suisse de soja comum e de soja livre de lipoxigenase, enriquecidos com cálcio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 3, p. 766–770, 2010.

BORGES, R. D. S. *et al.* Avaliação sensorial de suco de uva cv. Isabel em cortes com diferentes cultivares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. spe1, p. 584–591, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol.*, London. v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961. *Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprêgo de aditivos químicos a alimentos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/50040_61.htm>. Acesso em: 07 de ago. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA n. 14, de 28 de junho de 1978. *Estabelece o padrão de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/14_78.htm>. Acesso em: 15 de nov. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. *Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria*. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=109>>. Acesso em: 07 de nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 386, DE 5 DE AGOSTO DE 1999a. *Aprovar o regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções*. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0556e3004745787485bdd53fbc4c6735/RES_OLUCAO_386_1999.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 12 jan de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de uva*. Instrução Normativa Nº 1, de 07 de janeiro 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Estabelece o padrão microbiológico para bebida a base de soja, aromatizada ou não, desengordurada ou não, refrigerada e similares, extrato desidratado e proteína texturizada de soja, desengordurada ou não e similares*. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001b. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01_anvisa.pdf> Acesso em: 07 de nov. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001a. *Aprova o Regulamento técnico para irradiação de alimentos*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 jan. 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Aprova o Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional*. Resolução-RDC n. 360, de 23 de dezembro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 de dezembro 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=RotulagemNutricionaldeAlimentosEmbalados>>. Acesso em: 17 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regimento Interno aprovado pela resolução RDC nº 25, de 15 de fevereiro de 2005c. *Aprova o uso dos aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e limites máximos para a Categoria de Alimentos: Produtos Protéicos – Subcategoria: Bebidas não alcoólica a base de soja ou alimentos com soja líquidos*. Brasília, 2005c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005b. *Regulamento Técnico para Produtos Protéicos de Origem Vegetal*. Diário Oficial da União, Brasília, 2005b. Disponível em: <

legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18827&word=>. Acesso em: 07 de nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005a. 1018p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos (2008)*. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 30 mar. 2015

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 259, de 31 de maio de 2010. *Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho*. Brasília, 2010. 24 p.

BRESOLIN, B.; GULARTE, M. A.; MANFROI, V. Água exógena em suco de uva obtido pelo método de arraste a vapor. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 7, n. 1, p. 922–933, 2013. Disponível em: <<http://revistas.utfpr.edu.br/pg/index.php/rbta/article/view/1040>>.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Método de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.

BRUNE, M. F. S. S. *et al.* Avaliação bioquímico-nutricional de uma linhagem de soja livre do inibidor de tripsina Kunitz e de lectinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 3, p. 657–663, 2010.

BRUNELLI, L. T.; VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização química e sensorial de bebida mista de soja e uva. *Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 3, p. 467–473, 2012.

CALEGUER, V. D. F.; BENASSI, M. D. T. Efeito da adição de polpa, carboximetilcelulose e goma arábica nas características sensoriais e aceitação de preparados em pó para refresco sabor laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 270–277, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000200010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

CALLOU, K. R. D. A. *et al.* Isoflavones and antioxidant capacity of commercial soy-based beverages: Effect of storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 7, p. 4284–4291, 2010.

CAMARGO, U.A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. *BRS VIOLETA: Nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 8 p. (Comunicado Técnico, 63).

CASÉ, F. *et al.* Produção de “leite” de soja enriquecido com cálcio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 86–91, 2005.

CASTILHOS, M. B. M. *et al.* Pre-drying and submerged cap winemaking: Effects on polyphenolic compounds and sensory descriptors. Part I: BRS Rúbea and BRS Cora. *Food Research International*, v. 75, p. 374–384, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915300430>>.

CENA. Centro de Energia Nuclear na agricultura. *Divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais*. Disponível em: <http://www.cena.usp.br/irradiacao/efeitos.htm> Acesso em: 05 fev. 2015b.

CENA. Centro de Energia Nuclear na agricultura. *Divulgação dos benefícios da irradiação de alimentos e/ou outros materiais*. Disponível em: http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios_old.htm Acesso em: 05 fev. 2015 a.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200036>

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. *Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas*. Viçosa: UFV, 1999. 81 p. (Cadernos didáticos, 66).

CHIEBAO, H. P. *Estudos de conservação de mandioquinha-salsa (Arracacia xanthorrhiza Bancroft.): efeitos da embalagem, radiação gama e temperatura de armazenamento*. 2008. 2008.

CIABOTTI, S. *et al.* Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* v. 27, n. 3, p. 643–648, 2007.

CILLA, A. *et al.* Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 29, p. 7282–7290, 2012.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 32, n. 2 p. 167- 171, 1998.

COMARELLA, C. G.; SAUTTER, C., EBERT, L. C.; PENNA, N. G. Polifenóis totais e avaliação sensorial de suco de uvas Isabel tratadas com ultrassom. *Braz. J. Food Technol.*, IV SSA, p. 69-73, 2012.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da safra brasileira-grãos 2015/2016*. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_11_11_02_58_boletim_graos_dezembro_2015.pdf>Acesso em: 15 de dezembro de 2015

COODETEC. *Tecnologia da nossa terra*. Soja e Saúde. São Paulo, 2008. Disponível em: www.coodetec.com.br. Acesso em: 05 de janeiro de 2010.

DE BARROS, E. A. *et al.* Chemical composition and lipoxigenase activity in soybeans (*Glycine max* L. Merr.) submitted to gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 98, p. 29–32, maio 2014. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X14000085>>. Acesso em: 27 jan. 2014.

DIXIT, A. K. *et al.* Antioxidant potential and radioprotective effect of soy isoflavone against gamma irradiation induced oxidative stress. *Journal of Functional Foods*, v. 4, n. 1, p. 197–206, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.10.005>>.

DIXIT, A. K. *et al.* Effect of gamma irradiation on lipoxygenases, trypsin inhibitor, raffinose family oligosaccharides and nutritional factors of different seed coat colored soybean (*Glycine max* L.). *Radiation Physics and Chemistry*, v. 80, n. 4, p. 597–603, abr. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X10004718>>. Acesso em: 16 maio 2013.

DIXIT, A. K. *et al.* Gamma irradiation induced enhancement in isoflavones, total phenol, anthocyanin and antioxidant properties of varying seed coat colored soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 7, p. 4298–4302, 2010.

DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P., & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356, 1956.

DUTRA, M. C. P. *et al.* Influência da variedade de uvas nas características analíticas e aceitação sensorial do suco artesanal. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 16, n. 3, p. 265–272, 2014.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *A soja*. Londrina: EMBRAPA Soja. 2007a. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16>. Acesso em: 28 maio 2012.

_____. *Extrato de soja e produtos derivados*. Londrina: EMBRAPA Soja. 2003. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106148/1/ID-23611.pdf>>

_____. *Soja na alimentação*. Londrina: EMBRAPA Soja. 2007 b. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao>. Acesso em: 28 novembro 2015.

_____. *Soja na alimentação-Sabor suave*. Londrina: EMBRAPA Soja. 2015. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=10>. Acesso em: 24 nov 2015.

_____. *Cultivares de Soja: Regiões Sul e Central do Brasil (2010/2011)*. Londrina: EMBRAPA Soja. 2015. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/FolhetoSoja.pdf>>. Acesso em: 24 nov 2015.

ESTEVES, E. A. *et al.* Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (LOX2 and LOX3). *Food Chemistry*, v. 122, n. 1, p. 238–242, set. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610002530>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

EVANGELISTA, J. *Tecnologia dos alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

- FARO, Z. P.; ARDITO, E.; BORGO, L. A. *Qualidade em alimentos II: conservação e processamento de alimentos*. Brasília, DF: UNB - Centro de Excelência em Turismo, 2002.
- FEDERIZZI, L. C. *A soja como fator de competitividade no mercosul : histórico, produção e perspectivas futuras*. Rio Grande do Sul: Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, 2008.
- FELLOWS, P.J. *Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.
- FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar. Tradução de Maria Carolina Minardi Guimarães; Cristina Leonhardt*. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, v. 45, p. 208-213, 2000.
- FREITAS, A. A. *et al.* Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. v. 28, n. 1, p. 172–177, 2008.
- GENOVESE, M. I. *et al.* Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 167-169, 2003
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superóxido dismutases. I. occurrence in Higher plants. *Plant Physiology*, 59:309-314, 1977.
- GIRI, S. K.; MANGARAJ, S. Processing influences on composition and quality attributes of soymilk and its powder. *Food Engineering Reviews*, v. 4, n. 3, p. 149–164, 5 maio 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12393-012-9053-0>>. Acesso em: 13 fev. 2014.
- GRANATO, D. *et al.* Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 3, p. C584–C593, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12794>>.
- GROLICHOVA, M.; DVOŘÁK, P.; MUSILOVA, H. Employing ionizing radiation to enhance food safety—a review. *Acta Veterinaria Brno*, v. 73, n. 1, p. 143–149, 2004. Disponível em: <<http://actavet.vfu.cz/pdf/200473010143.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2013.
- GUEREIRO, L. *Dossiê da soja: produto da soja*. Rio de Janeiro: Redetec, 2006. 25 p.
- GUERRA, C. C.; TONIETTO, J. *Fatores de Qualidade de Vinhos*. Uva. Pós-colheita/editor técnico Celito Crivellaro Terra; EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. Brasília: EMBRAPA Tecnológica, 67p. 2003.
- GURAK, P. D. *et al.* Avaliação de parâmetros físico-químicos de sucos de uva integral, néctares de uva e néctares de uva. *Revista de Ciências Exatas*, v. 27, n. 1-2, p. 1–15, 2008.

HOWELL, R. W.; CALDWELL, B. E. Genetic and other biological characteristics. In: Smith AK, Circle SJ (eds) Soybeans: chemistry and technology. *AVI Publishing Co, USA*, pp 27–60, 1978.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

HUANG, Y., RASCO, B. A., & CAVINATO, A. G. Fruit juices. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, v.3, n.4, p. 355–375. 2009.

IRRADIAÇÃO DOS ALIMENTOS. Consultoria e Assessoria Radiologia. *Nós e as radiações. Informativo CRTR06 (2011)*. Disponível em:
<<http://www.nuclear.radiologia.nom.br/diversos/esterili.htm>> Acesso em: 10 ago. 2012

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Radiation protection of foods and nature of microbial radiation resistance. In: JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. (Eds.). *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer, 2005. p. 371-390.

JO, C. *et al.* Irradiation application for color removal and purification of green tea leaves extract. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 66, p. 179–184, 2003.

JO, C.; AHN, D. U.; LEE, K. H. Effect of gamma irradiation on microbiological, chemical, and sensory properties of fresh ashitaba and kale juices. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 81, n. 8, p. 1076–1078, 2012.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13. ed. São Paulo: Nacional, 2002. 777 p. (Biblioteca universitária, série 3. Ciências puras, v. 4).

KAFERSTEIN, F. K. *Safe food more needed than ever before*. Geneve: World Health Organization, 1993. 22p.

KANEKO, S.; KUMAZAWA, K.; NISHIMURA, O. Studies on the key aroma compounds in soy milk made from three different soybean cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 59, n. 22, p. 12204–9, 23 nov. 2011. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21981068>>.

KANO, M. *et al.* Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 9, p. 2291–2296, 2006.

KELEBEK, H.; SELLI, S. Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. January, p. 1855–1862, 2011.

KIM, D. *et al.* Effects of gamma irradiation on the radiation-resistant bacteria and polyphenol oxidase activity in fresh kale juice. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 76, n. 7, p. 1213–1217, 2007. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X06005743>>.

KUMAR, V. *et al.* Sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) in soybean seeds as influenced by genotype and growing location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 8, p. 5081–5085, 2010.

LEE, J. W. *et al.* Effect of gamma irradiation on microbial analysis, antioxidant activity, sugar content and color of ready-to-use tamarind juice during storage. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, n. 1, p. 101–105, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.004>>.

LEE, J. W. *et al.* The effect of irradiation temperature on the non-enzymatic browning reaction in cooked rice. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 76, n. 5, p. 886–892, 2007.

LESSCHAEVE, I.; NOBLE, A. C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am J Clin Nutr*, v. 81, n. 1, p. 330S–335, 2005.

LIMA, E. C. S.; CARDOSO, M. H. Bebida de soja (*Glycine max*) e acerola (*Malpighia punicifolia*) enriquecida com cálcio. *Alimentos e nutrição*, v. 23, n. 4, p. 549–553, 2012.

LIMA FILHO, T. *et al.* Energia ionizante na conservação de alimentos : revisão. *B. CEPPA*, v. 30, n. 2, p. 243–254, 2012.

LIMA, M. D. S. *et al.* Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, v. 161, p. 94–103, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614005123>>.

LIMA, M. S. *et al.* Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chemistry*, v. 188, p. 384–392, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461500549X>>.

LOPES, C. G. *A soja na alimentação*. Juiz de Fora: Acesa.com, 2003. Disponível em: <<http://www.jfsservice.com.br/viver/arquivo/nutricao/2003/02/07-soja/>>. Acesso em: 27 nov. 2012.

LÓPEZ, R. Preferência por hábitos saudáveis gera excelentes oportunidades para o mercado. *Engarrafador Moderno*, v. 120, p. 8-14, maio 2004.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, N. *et al.* Identification and quantification of the main isoflavones and other phytochemicals in soy based nutraceutical products by liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1348, p. 125–136, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.090>>.

MA, L. *et al.* Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk. *Food Chemistry*, v. 173, p. 694–701, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016598>>.

MA, Y.; HUANG, H. Characterisation and comparison of phenols, flavonoids and isoflavones of soymilk and their correlations with antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 49, p. 2290–2298, 2014.

MAIA, M. J. L.; ROSSI, E. A.; CARVALHO, M. R. B. Qualidade e rendimento do “leite” de soja da unidade de produção de derivados da soja. *Alimentos e nutrição*, v. 17, n. 1, p. 65–72, 2006.

- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 659–664, 2005.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *B.CEPPA*, v. 24, n. 1, p. 59–82, 2006.
- MAMEDE, M. E. O. *et al.* Avaliação sensorial e colorimétrica de néctar de uva. *Alimentos e nutrição*, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2013.
- MARZAROTTO, V. Suco de Uva. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). *Bebidas Não Alcoólicas*. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. p. 359–384.
- MELO, S. S. *et al.* Efeito da goma arábica nas concentrações de colesterol hepático , sérico e fecal de ratos alimentados com semente de linhaça , óleo de linhaça e colesterol sintético. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, n. 2, p. 133–144, 2008.
- MERMELSTEIN, N.H. Top executives analyse food R&D in 2001 and beyond. *Food Technology*, v. 55, n. 9, p. 36-58, 2001.
- MINOLTA, K. *Precise color communication: color control from feeling to instrumentation*. Ramsey: Minolta Corporation Instrument Systems Division. 49p. 1994.
- MINOLTA, K. *Precise color Communication: Color control from perception to instrumentation*. 1998. Disponível em: <<http://www.konicaminolta.com>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- KORHONEN, H. Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, v. 55, n. 2, p. 79-88, 2002.
- MISHRA, B. B.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Shelf life extension of sugarcane juice using preservatives and gamma radiation processing. *Journal of food science*, v. 76, n. 8, p. M573–8, 2011. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417599>>.
- MISHRA, B.B.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Shelf-life extension of fresh ginger (Zingiber officinale) by gamma irradiation. *J Food Sci.* v. 64, p. 274–279, 2004.
- MOHAJER, S. *et al.* Stimulatory effects of gamma irradiation on phytochemical properties , mitotic behaviour , and nutritional composition of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop .). *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.
- MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. *Soja: suas aplicações*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1996. 259 p.
- MORALES-DE LA PEÑA, M. *et al.* Impact of high intensity pulsed electric field on antioxidant properties and quality parameters of a fruit juice–soymilk beverage in chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 6, p. 872–881, jul. 2010a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810000344>>. Acesso em: 15 maio 2013.
- MORALES-DE LA PEÑA, M. *et al.* Impact of high intensity pulsed electric fields or heat treatments on the fatty acid and mineral profiles of a fruit juiceesoy milk beverage during

storage. *Food Control*, v. 22, n. 12, p. 1975–1983, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.015>>.

MORALES-DE PEÑA, M. *et al.* Changes on phenolic and carotenoid composition of high intensity pulsed electric field and thermally treated fruit juice – soymilk beverages during refrigerated storage. *Feed Mix*, v. 129, p. 982–990, 2011 b.

MORALES-DE LA PEÑA, M. *et al.* Isoflavone profile of a high intensity pulsed electric field or thermally treated fruit juice-soymilk beverage stored under refrigeration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, n. 4, p. 604–610, 2010b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2010.08.005>>.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 411–424, 2004.

MORENO-MONTORO, M. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 38, p. 19–26, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157514001653>>.

NARESH, K. *et al.* Enhancing antioxidant activity, microbial and sensory quality of mango (*Mangifera indica* L.) juice by γ -irradiation and its in vitro radioprotective potential. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. July, p. 4054–4065, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1502-8>>.

NASSER, A. L. M. *et al.* Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 2, p. 275–279, 2011.

NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; WEI, L.S. Illinois process for separation of soymilk. *J Food Sci* 41:57–61, 1976.

NUNES, J. S. *et al.* Avaliação do perfil físico e reológico de bebida de soja sabor iogurte com polpa de morango. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 9, n. 1, p. 229–233, 2014.

OLIVEIRA, A. C. G. *et al.* Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 4, p. 863–873, 2007.

OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* Development of an acai-soymilk beverage: characterization and consumer acceptance. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 13, n. 04, p. 306–312, 2011. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v13n4437a.pdf>>.

ÖZCAN, M. M.; ALPAR, Ş.; AL JUHAIMI, F. The effect of boiling on qualitative properties of grape juice produced by the traditional method. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 9, p. 5546–5556, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1628-8>>.

PAGANO, M.; GAUVREA, U. K. *Princípios de Bioestatística*. Ed Thompson. 2004.

- PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa e sucos de frutas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(1): 147-152, jan.-mar. 2005.
- PEDNEKAR, M. *et al.* Radiation processing and functional properties of soybean (Glycine max). *Radiation Physics and Chemistry*, v. 79, n. 4, p. 490–494, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.10.009>>.
- PLAZA, L. *et al.* Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high-pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization. *European Food Research and Technology*, v. 223, n. 4, p. 487–493, 2006. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33746134778&partnerID=40&md5=6d5ae74cf64d6d59ece327cfd2296469>>.
- POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, n. 8, p. 1653–1666, 2009.
- PONTES, P. R. B. *et al.* Sensory attributes and acceptance of commercial grape juices. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*. v. 30, n. 2, p. 313–318, 2010. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77955533781&partnerID=40&md5=8462e5097bcc2dbd972f20a6576806c5>>.
- POPOVIT, B. M. *et al.* Enhancement of antioxidant and isoflavones concentration in gamma irradiated soybean boris. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- POTTER, N.N.; HOTCHIKISS, J.H. *Food Science*. 5.ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 608 p.
- POTTER, R. M. *et al.* Characteristics of wild blueberry–soy beverages. *LWT - Food Science and Technology*, v. 40, n. 5, p. 807–814, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643806001253>>.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.
- RIBEIRO, J. M. M. *et al.* Radiação gama sobre a microbiota de ração avícola e *Aspergillus* spp. *Ciência Rural*, v. 39, n. 5, p. 1452–1458, 2009.
- RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. *Ciência Rural*, v. 36, n. 2, p. 689–692, 2006.
- ROBINSON, D. S. Food Biochemistry and nutritional value. *Logman Scientific and Technical*: Essex, 1987. 320 p.
- RODRIGUES, R. D. S.; MORETTI, R. H. Caracterização físico-química de bebida protéica elaborada com extrato de soja e polpa de pêssegos. *B. CEPPA*, v. 26, n. 1, p. 101–110, 2008.

ROSSI, E. A. Sensory acceptance of a functional beverage based on orange juice and soymilk estudo da aceitação sensorial de uma bebida à base de suco de laranja e extrato aquoso de soja. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6, n. 2, p. 153–156, 2003.

SAKHALE, B. K.; PAWAR, V. N.; RANVEER, R. C. Studies on the development and storage of whey based rts beverage from mango cv. Kesar. *Journal of Food Processing & Technology*, v. 03, n. 03, 2012.

SCHIAVÃO-SOUZA, A. T. D. *et. al.* Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: Otimização do Meio de Cultura. *Braz. J. Food Technol.* Preprint Serie, n.269, 2007.

SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. *Soja -Análise da Conjuntura Agropecuária*. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/Soja_2014_15.pdf. Acesso em: 15 de dez. de 2015

SÉFORA-SOUSA, M.; DE ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 15, n. 4, p. 617–626, 2013.

SERAFINI, M. The effects of minimal processing operations on the nutritional components of fresh-cut produce. In: SECOND INTERNATIONAL CONFERENCE ON FRESH-CUT PRODUCE. Gloucestershire, UK. *Conference Proceedings*. Campden & Chorleywood Food Research Association Group. 13 – 14, September, 2001.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: Implicações para a saúde. *Revista de Nutricao*, v. 24, n. 6, p. 895–904, 2011. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865074339&partnerID=40&md5=02e6e244369da034aef6e283e57e05f7>>.

SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. *Food Chemistry*, v. 78, n. 2, p. 187–205, 2002.

SILVA, J.; PRUDÊNCIO, S.; FELBERG, I. Aceitabilidade de bebidas preparadas a partir de diferentes extratos hidrossolúveis de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 12, p. 1779–1784, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n12/a16v4212.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2013.

SILVA, J.B.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; PRUDÊNCIO, S.H. Chemical and physical composition of grain type and food type soybean for food processing. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n.7, p. 777-784, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos*. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001, 229 p.

SILVA, M. S; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v 26 ,n 03 , p 571-576, 2006.

- SLOAN, A. E. Top 10 global food trends. *Food Technology*, 59(4), p.20–32, 2005.
- SONG, H. P. *et al.* Effects of gamma irradiation on the microbiological, nutritional, and sensory properties of fresh vegetable juice. *Food Control*, v. 18, n. 1, p. 5–10, 2007.
- SONG, H.-P. *et al.* Effect of gamma irradiation on the microbiological quality and antioxidant activity of fresh vegetable juice. *Food Microbiology*, v. 23, n. 4, p. 372–378, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002005000596>>.
- SOUZA, G.; VALLE, J. L. E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 34, n. 2, p. 61-69, jul./dez. 2000.
- TACO. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. 4. ed. Campinas: NEPA (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação) – UNICAMP, 2011.
- TASHIMA, E. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja (*Glicine max* L. Merrill) comercial adoçado com sacarose e com sucralose. *Boletim do CEPPA*, v. 21, n. 2, p. 409–428, 2003.
- TEWARI, K. *et al.* Gamma irradiation induces reduction in the off-flavour generation in soybean through enhancement of its antioxidant potential. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, p. 2041–2051, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10967-014-3803-9>>.
- TOALDO, I. M. *et al.* Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. *Food Chemistry*, v. 173, p. 527–535, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016549>>.
- TOLEDO, T. C. . *et al.* Effects of gamma radiation on total phenolics, trypsin and tannin inhibitors in soybean grains. *Radiation Physics and Chemistry*, p. 1653–1656, 2007a.
- TOLEDO, T. C. F. *et al.* Composição , digestibilidade protéica e desaminação em cultivares brasileiras de soja submetidas à radiação gama. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 4, p. 812–815, 2007.
- TONELI, J. T. D. C. L. ; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 7, n. 1517-8595, p. 181–204, 2005.
- TORREZAN, R. *et al.* Avaliação do perfil sensorial de alimento com soja sabor laranja. *Bol. CEPPA*, v. 22, n. 2, p. 199-216, 2004.
- ULIANA, M. R. *Bebida mista de extrato de soja e suco de amora : bebida mista de extrato de soja e suco de amora*. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.
- URBAIN, W. M. Food irradiation. *Food science and technology*. Florida: Academic Press, 1986.

VALIM, M. F. *et al.* Sensory acceptance of a functional beverage based on orange juice and soymilk. *Braz. J. Food Technol.*, v.6, n.2, p.153-156, Jul./Dez. 2003

VARIYAR, P. S.; LIMAYE, A.; SHARMA, A. Radiation-induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max* Merrill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 3385–3388, 2004.

VARO, S. D. *et al.* Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 326–331, 2007.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT A, P. Hamamelis virginiana: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts, *Pharm.Acta Helv.*, 67(1), 11-14, 1992.

VERARDO, V. *et al.* Determination of free and bound phenolic compounds in soy isoflavone concentrate using a PFP fused core column. *Food Chemistry*, v.185, p.239–244,2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615004628>

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; SPOTO, M. H. F. Efeito da radiação gama sobre o perfil sensorial de suco de laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 28–32, 2003.

Vieira, S. *Análise de Variância*. Ed. Atlas, 2006.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.47, p.1801-1812, 1999.

WHENT, M. *et al.* Isoflavone composition and antioxidant capacity of modified-lipoxygenase soybeans grown in Maryland. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 59, n. 24, p. 12902–9, 28 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098380>>.

WILKENS, W.F.; MATTICK, L.R.; HAND, D. B. Effects of processing method on oxidative off-flavors of soybean milk. *Food Technol.* v.21 p.1630–1633, 1967.

WILL, F.; BAUCKHAGE, K.; DIETRICH, H. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases : analytical data of the corresponding juices. *European Food Research and Technology*. v. 211, n. 4, p. 291-297, 2000.

WONG, M. C. Y. *et al.* Health benefits of isoflavones in functional foods, proteomic and metabonomic advances. *Inflammopharmacology*, v. 16, n. 5, p. 235–239, 2008.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, v. 16, n. 9, p. 423–428, 2005.

YUN, J. *et al.* Effect of gamma irradiation on microbial load, physicochemical and sensory characteristics of soybeans (*Glycine max* L. Merrill). *Radiation Physics and Chemistry*, v. 81, n. 8, p. 1198–1202, ago. 2012. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X11004282>>. Acesso em: 15 maio 2013.

ZHANG, Y.; CHANG, S. K. C.; LIU, Z. Isoflavone profile in soymilk as affected by soybean variety, grinding, and heat-processing methods. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 5, p. C983–C988, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12839>>.

ZHONG, K. *et al.* Inactivation and conformational change of horseradish peroxidase induced by pulsed electric field. *Food Chemistry*, v. 92, n. 3, p. 473–479, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604006247>>.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “EFEITO DOS MÉTODOS DE PROCESSAMENTOS E CONSERVAÇÃO DE BEBIDAS MISTAS DE EXTRATO DE SOJA E SUCO DE UVA”, que pretende estudar a diferença entre métodos de processamentos da soja e o efeito da conservação sobre a qualidade sensorial de extrato hidrossolúvel de soja, suco de uva e bebida mista de extrato de soja e suco de uva.

O sr(a). foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa para caracterizar sensorialmente (os atributos: sabor, aroma, cor e avaliação global) as amostras selecionadas, a partir do teste de escala hedônica, sendo um teste de aceitação que possui uma escala de 1 (desgostei) a 9 (gostei muito). Serão servidos 30mL de cada amostra, com o máximo de quatro amostras por sessão. Será realizada apenas uma sessão de análise por dia, os provadores não precisarão ingerir toda a quantidade servida, apenas a quantidade que julgar suficiente para formular as respostas dos testes. Os produtos fabricados estarão adequados ao permitido pela legislação brasileira e serão isentos de substâncias nocivas à saúde humana, não oferecendo riscos.

O conhecimento dessas características permite avaliar se a bebida obtida possui qualidade nutritiva e sensorial. Além disso, poderá ser observado o quanto a técnica de conservação pode interferir no produto analisado.

Caso o participante tenha alguma reação alérgica à soja ou aos seus derivados, o mesmo não poderá realizar esta análise sensorial.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito.

Você poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa.

É garantido total sigilo do seu nome, em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome: _____

Assinatura: _____

Pesquisadora: Érica Amanda de Barros Data:

Assinatura: _____

Orientador: Prof Dr Fernando Broetto,

ANEXO 2

TESTE DE ACEITABILIDADE E IDEAL

Análise sensorial do Extrato Hidrossolúvel de Soja (extração a quente x frio) (experimento 2)

A) Avalie cada amostra usando o (N° DA ESCALA) abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou.

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| 1. Desgostei muitíssimo | 6. Gostei ligeiramente |
| 2. Desgostei muito | 7. Gostei regularmente |
| 3. Desgostei regularmente | 8. Gostei muito |
| 4. Desgostei ligeiramente | 9. Gostei muitíssimo |
| 5. Indiferente | |

Indicar o quanto você gostou da **Aparência** da bebida mista.

| | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|---------------------|-----------------|----------------|
| Amostra: | Muito mais intenso | Um pouco mais | A aparência da | Um pouco | Muito menos |
| N° da | do que eu gosto | intenso do que | bebida é intensa do | menos intenso | intenso do que |
| escala | | eu gosto | jeito que eu gosto | do que eu gosto | eu gosto |
| Q: _____ | () | () | () | () | () |
| F: _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou do **Aroma** da bebida mista.

| | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|
| Amostra: | Muito mais intenso | Um pouco mais | O aroma da bebida | Um pouco | Muito menos |
| N° da | do que eu gosto | intenso do que | é intenso do jeito | menos intenso | intenso do que |
| escala | | eu gosto | que eu gosto | do que eu gosto | eu gosto |
| Q: _____ | () | () | () | () | () |
| F: _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou do **Sabor** da bebida mista.

| | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|----------------------|-----------------|----------------|
| Amostra: | Muito mais intenso | Um pouco mais | O sabor da bebida é | Um pouco | Muito menos |
| N° da | do que eu gosto | intenso do que | intenso do jeito que | menos intenso | intenso do que |
| escala | | eu gosto | eu gosto | do que eu gosto | eu gosto |
| Q: _____ | () | () | () | () | () |
| F: _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou da **consistência** da bebida mista.

| | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|---------------------|-----------------|----------------|
| Amostra: | Muito mais intenso | Um pouco mais | A consistência da | Um pouco | Muito menos |
| N° da | do que eu gosto | intenso do que | bebida é intensa do | menos intenso | intenso do que |
| escala | | eu gosto | jeito que eu gosto | do que eu gosto | eu gosto |
| Q: _____ | () | () | () | () | () |
| F: _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou da **acidez** da bebida mista.

| | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|
| Amostra: | Muito mais intenso | Um pouco mais | A acidez da bebida | Um pouco | Muito menos |
| N° da | do que eu gosto | intenso do que | é intensa do jeito | menos intenso | intenso do que |
| escala | | eu gosto | que eu gosto | do que eu gosto | eu gosto |
| Q: _____ | () | () | () | () | () |
| F: _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou da **Avaliação global** da bebida mista.

| | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|---------------------|-----------------|----------------|
| Amostra: | Muito mais intenso | Um pouco mais | A Avaliação global | Um pouco | Muito menos |
| N° da | do que eu gosto | intenso do que | da bebida é intensa | menos intenso | intenso do que |
| escala | | eu gosto | do jeito que eu | do que eu gosto | eu gosto |
| Q: _____ | () | () | gosto | () | () |
| F: _____ | | | | | |

OBS: _____

ANEXO 3

O modelo do teste descrito abaixo foi utilizado para a análise sensorial do EHS (experimento 3- etapa 1), do suco de uva (experimento 3- etapa 2) e da bebida mista (experimento 4).

TESTE DE ACEITABILIDADE E IDEAL
Análise sensorial de Bebida Mista de EHS e suco de uva

A) Avalie cada amostra usando o (N° DA ESCALA) abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou.

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| 1. Desgostei muitíssimo | 6. Gostei ligeiramente |
| 2. Desgostei muito | 7. Gostei regularmente |
| 3. Desgostei regularmente | 8. Gostei muito |
| 4. Desgostei ligeiramente | 9. Gostei muitíssimo |
| 5. Indiferente | |

Indicar o quanto você gostou da **Aparência** da bebida mista.

| Amostra: N° da escala | Muito mais intenso do que eu gosto | Um pouco mais intenso do que eu gosto | A aparência da bebida é intensa do jeito que eu gosto | Um pouco menos intenso do que eu gosto | Muito menos intenso do que eu gosto |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---|--|---|
| _____ | () | () | () | () | () |
| _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou do **Aroma** da bebida mista.

| Amostra: N° da escala | Muito mais intenso do que eu gosto | Um pouco mais intenso do que eu gosto | O aroma da bebida é intenso do jeito que eu gosto | Um pouco menos intenso do que eu gosto | Muito menos intenso do que eu gosto |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---|--|---|
| _____ | () | () | () | () | () |
| _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou do **Sabor** da bebida mista.

| Amostra: N° da escala | Muito mais intenso do que eu gosto | Um pouco mais intenso do que eu gosto | O sabor da bebida é intenso do jeito que eu gosto | Um pouco menos intenso do que eu gosto | Muito menos intenso do que eu gosto |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---|--|---|
| _____ | () | () | () | () | () |
| _____ | | | | | |

Indicar o quanto você gostou da **Avaliação global** da bebida mista.

| Amostra: N° da escala | Muito mais intenso do que eu gosto | Um pouco mais intenso do que eu gosto | A avaliação global da bebida é intensa do jeito que eu gosto | Um pouco menos intenso do que eu gosto | Muito menos intenso do que eu gosto |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---|--|---|
| _____ | () | () | () | () | () |
| _____ | | | | | |

OBS: _____
