

**Francelina Flor de Sousa
Correia**

**Formulação de produtos alimentares comerciais à
base de soja**

Nº Mec.: 15975

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para preencher os requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia na área de Biotecnologia Alimentar, feito sob a supervisão científica do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e pelo Engenheiro Ricardo Santos, Director de Operações da empresa Nutre – Indústrias Alimentares, S.A.

O Júri

Presidente

Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Professor Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva (orientador)

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo

Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Terminado este trabalho, não podia deixar de agradecer a todos os que de alguma forma me apoiaram na sua realização.

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, orientador científico deste trabalho, toda a compreensão, apoio, e dedicação que me concedeu.

Ao Engenheiro Ricardo Filipe Conceição Bento dos Santos, Director de Operações da empresa NUTRE – Indústrias Alimentares, S.A. pelo entusiasmo, confiança, apoio e disponibilidade que me dispensou no decorrer da realização deste trabalho.

À administração da NUTRE – Indústrias Alimentares, S.A. pela oportunidade que me concedeu.

A toda a equipa da NUTRE – Indústrias Alimentares, S.A. pelo apoio e excelente ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram.

Ao meu namorado pela compreensão e apoio incondicional nos momentos de dúvidas e hesitação, e na resolução de problemas informáticos.

À minha irmã e restantes familiares pela compreensão, carinho e paciência nos momentos mais angustiantes.

Não posso deixar de agradecer e homenagear de forma particular os meus Pais, que na sua humildade sempre acreditaram que o conhecimento é a arma do sucesso. Agradeço-Vos pois, todas as lutas e sacrifícios em prol de um sonho comum.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”*

José de Alencar

Palavras-Chave Soja; Tofu; “Iogurtes” de soja; Isolados; Soja Texturizada; Okara; Isoflavonas

Resumo A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é de todas as leguminosas, a que tem vindo a despertar grande interesse junto da indústria e dos consumidores graças à sua versatilidade, ao seu valor nutricional e ao facto de representar uma importante alternativa alimentar de baixo custo, em substituição das proteínas de origem animal (ditas proteínas de custo elevado, como carne, leite e ovos).

O interesse nos mais variados derivados da soja prende-se muito com a quantidade e qualidade da sua proteína, bem como ao facto de se constituírem como fonte de outros compostos, como fibras, oligossacarídeos com potencial prebiótico, como rafinose, estaquiase e nutrientes como vitaminas e minerais.

O presente trabalho teve como principal objectivo o desenvolvimento de duas bebidas de soja, nomeadamente uma bebida aromatizada e uma bebida com cacau, bem como, sobremesas fermentadas de soja. Pretendia-se pois, que estes produtos pudessem integrar o portfólio de produtos da empresa Nutre – Indústrias Alimentares, S.A. Assim, começou por fazer-se um estudo de mercado dos produtos semelhantes e concorrentes aos que se pretende desenvolver, de forma a definir os requisitos pretendidos. Houve necessidade de desenvolver todos os procedimentos analíticos a implementar no laboratório e definir os parâmetros a analisar em cada um dos produtos. As formulações desenvolvidas foram então avaliadas em termos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

Este trabalho apoiou de forma inequívoca o desenvolvimento das duas bebidas de soja pretendidas, ficando ambos os produtos no portfólio da empresa. No caso das sobremesas fermentadas de soja, não foi possível efectuar o ensaio industrial, que permitiria efectuar as devidas validações do produto desenvolvido laboratorialmente, devido a restrições ao nível de planeamento de produção, contudo, a direcção do departamento de investigação e desenvolvimento considera que os ensaios laboratoriais foram bastante satisfatórios e promissores, pelo que pretendem replicar o procedimento laboratorial a nível industrial.

Keywords

Soy; Tofu; Soy Yogurt; Soy Isolates; Texturized soy; Okara; Isoflavones

Abstract

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] has aroused great interest among industry and consumers thanks to its versatility, its nutritional value and the fact that it represents an important low cost alternative food, to replace the animal protein (said protein high cost, such as meat, milk and eggs).

Interest in various soy products is related to the quantity and quality of their protein as well as the fact that they constitute a source of other compounds, such as fibers, oligosaccharides with prebiotic potential, such as stachyose and raffinose and other nutrients such as vitamins and minerals.

This work had as main objective the development of two soy beverages, including a flavored drink and a drink with cocoa and, fermented soy desserts. It was intended therefore that these products could integrate the portfolio of Nutre – Indústrias Alimentares S.A. Therefore, it began by making a market study of similar products and competitors to be developed in order to define the requirements intended. There was need to develop all analytical procedures to be implemented in the lab and set the parameters to be analyzed in each product. The developed formulations were then evaluated in physicochemical terms, microbiological and sensory.

This work supported unequivocally the development of the two required soy beverages, getting both products in the company portfolio. In the case of soybean fermented desserts, it was not possible to be industrially tested which would perform the necessary validations of the product developed in laboratory due to restrictions in terms of production planning, however, the direction of the research and development department considers that laboratory tests were very satisfactory and promising, so aiming to replicate the laboratory procedure at industrial level.

Índice

Índice de Figuras	
Índice de Tabelas.....	
Índice de Gráficos	
Índice de Anexos.....	
Lista de abreviaturas	
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. A história	2
1.1. NUTRE – Indústrias Alimentares S.A.	2
1.2. A Soja	3
1.2.1. COMPOSIÇÃO.....	4
1.2.1.1. Proteína	4
1.2.1.2. Lípidos	10
1.2.1.3. Hidratos de carbono	11
1.2.1.4. Vitaminas	12
1.2.1.5. Minerais	13
1.2.1.6. Fitoestrogénios.....	14
1.2.1.6.1. Isoflavonas	15
1.2.1.6.1.1. Genisteína	17
2. Benefícios do consumo de soja e seus derivados	17
2.1. Nutricionais	17
2.2. Saúde	17
3. Processo produtivo - Evolução.....	18
3.1. Factor anti-nutricional	19
3.2. Oxidação lipídica.....	20
3.3. Sub-produto – <i>Okara</i>	21
3.3.1. Composição da soja versus <i>Okara</i>	22
3.3.1.1. Caracterização físico-química.....	22
4. Derivados de soja	23
4.1. Extracto hidrossolúvel de soja ou “Leite de soja”	23
4.2. “Iogurte” de soja.....	25
4.3. <i>Tofu</i>	26
II. OBJECTIVOS E PLANEAMENTO	29
III. MÉTODOS E MATERIAIS	31

5.	Desenvolvimento de novos produtos.....	32
6.	Processo produtivo	32
7.	Desenvolvimento de bebida de soja ultrapasteurizada aromatizada e com adição de cacau.....	34
7.1.	Formulação	34
7.2.	Parâmetros físico-químicos	36
7.2.1.	Determinação de pH e Sólidos solúveis totais (°Bx).....	36
7.2.2.	Proteína.....	36
7.2.2.1.	Controlo do Teor de Proteína no extracto hidrossolúvel de soja.....	36
7.2.3.	Lípidos	37
7.2.4.	Determinação do teor de humidade e teor de sólidos.....	37
7.2.5.	Viscosidade aparente	38
7.3.	Análise sensorial.....	38
7.4.	Definição do tempo de vida útil	39
7.4.1.	Ensaio microbiológicos.....	39
7.4.1.1.	Preparação de amostras e diluições.....	39
7.4.1.2.	Mesófilos totais aeróbicos	39
7.4.2.	Ensaio de estabilidade	39
7.4.2.1.	Bebida de soja original	40
7.4.2.2.	Bebida de soja com cacau	40
7.4.3.	Estudo de vida útil em tempo real	41
8.	Desenvolvimento de “iogurte” de soja	42
8.1.	Formulação	43
8.2.	Análises físico-químicas.....	44
8.2.1.	Acidez titulável.....	44
8.2.2.	pH e Sólidos solúveis totais (°Brix).....	44
8.2.3.	Viscosidade aparente	44
8.3.	Controlo microbiológico durante o armazenamento	45
8.3.1.	Mesófilos aeróbios totais ou Microrganismos a 30°C	45
8.3.2.	Contagem de bolores e leveduras	45
8.3.3.	Contagem de bactérias lácticas totais	45
8.3.3.1.	Contagem de Lactobacillus bulgaricus	46
8.3.3.2.	Contagem de Streptococcus thermophilus.....	47
8.4.	Análise sensorial.....	47
IV.	RESULTADOS	49

9.	Resultados.....	50
9.1.	Extracto hidrosolúvel de soja	50
9.2.	Bebidas de soja	52
9.2.1.	Proteína.....	53
9.2.2.	Lípidos	53
9.2.3.	Viscosidade.....	55
9.2.4.	Análise sensorial.....	56
9.2.5.	Microbiologia	57
9.2.6.	Ensaio de estabilidade	57
9.2.6.1.	Bebida de soja natural.....	57
9.2.6.2.	Bebida de soja com cacau	61
9.2.7.	Estudo de vida útil em tempo real	64
9.3.	Sobremesa fermentada de soja	66
9.3.1.	Formulação	66
9.3.2.	Controlo de parâmetros físico-químicos ao longo do período de armazenamento da sobremesa fermentada de soja	70
9.3.2.1.	Acidez titulável	71
9.3.2.2.	pH e Sólidos Solúveis	71
9.3.2.3.	Viscosidade aparente	74
9.3.3.	Microbiologia	75
9.3.4.	Análise sensorial.....	79
10.	Conclusão	81
V.	BIBLIOGRAFIA	83
VI.	ANEXOS	91

Índice de Figuras

Figura 1 - Unidade fabril da Nutre – Industrias Alimentares, S.A.....	3
Figura 2 – Grão de soja	3
Figura 3 - Conteúdo em lípidos da semente de soja (Cederroth and Nef 2009)	10
Figura 4 – Estrutura química da Rafinose, Estaquiase e Verbascose (Min 2008).....	12
Figura 5 – Estrutura de vários fitoestrogénios (Zhao and Mu 2011).....	15
Figura 6 – Estrutura molecular das isoflavonas e do 17- β -estradiol (Cederroth and Nef 2009).....	16
Figura 7 – Métodos de produção de bebida de soja (Golbitz 1995).....	19
Figura 8 – Processo de produção de iogurte de soja (Imram et al. 2003).....	26
Figura 9 – Microestrutura do <i>tofu</i> e correspondente agente coagulante utilizado (Boye and Ribéreau 1999).....	27
Figura 10 – Esquema do processo de desenvolvimento de novos produtos implementado na Nutre – Industrias Alimentares, S.A.....	32
Figura 11 - Esquema do processo produtivo de bebida de soja ultrapasteurizada.....	33
Figura 12 - Analisador de dispersões da marca LUMISIZER	40
Figura 13 – Imagens microscópicas do <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (a) e <i>Streptococcus thermophillus</i> (b) (Bashiti 2010).....	46
Figura 14 – Boletim analítico da bebida de soja produzida no ensaio industrial.....	54
Figura 15 – Perfil de transmissão das amostras de bebida original em análise.....	58
Figura 16 - Diferenças de estabilidade entre as amostras, com base no índice de instabilidade.....	59
Figura 17 - Curva de separação da cada uma das amostras, em função do tempo do ensaio	59
Figura 18 - Curva de separação para uma aceleração de 575g.....	60
Figura 19 - Perfis de transmissão de cada uma das amostras de bebida de soja com cacau	61
Figura 20 - Célula com amostra em análise e correspondência do gráfico gerado com as respectivas fases	62
Figura 21 – Comparação do índice de instabilidade das diferentes amostras em análise ..	63
Figura 22 – Evolução da separação das amostras em função do tempo.....	63

Figura 23 – Boletim analítico da 4ª formulação de sobremesa fermentada de soja.....	68
Figura 24 – Curva de fermentação tipo (CHR-Hansen 2011)	72
Figura 25 – Folha de prova utilizada na análise sensorial interna de bebidas de soja	126
Figura 26 - Folha de prova utilizada na análise sensorial interna de sobremesas fermentadas de soja	127

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição do grão de soja expressa em g por 100g em base seca (Mateos-Aparicio et al. 2008).....	4
Tabela 2 – Composição em aminoácidos do grão de soja (Mateos-Aparicio et al. 2008) .	5
Tabela 3 - Fracções proteicas do grão de soja (deMan 2013)	6
Tabela 4 – Efeito da temperatura sobre algumas propriedades físicas das proteínas de soja (Kinsella 1979b)	8
Tabela 5 – Propriedades funcionais das proteínas de soja em diferentes alimentos (Jooyandeh 2011).....	9
Tabela 6 – Vitaminas presentes em farinha desengordurada de soja (MacLeod and Ames 1988).....	13
Tabela 7 – Conteúdo mineral dos grãos de soja (MacLeod and Ames 1988)	13
Tabela 8 – Funções fisiológicas associadas às principais proteínas de soja e aos constituintes minoritários (Jooyandeh 2011)	18
Tabela 9 - Composição média dos grãos de soja, do extrato aquoso e do <i>Okara</i> em base seca (g/100g) (Bowles and Demiate 2006)	23
Tabela 10 – Cuidados a verificar nas diferentes etapas do processo de produção do extracto hidrossolúvel de soja.....	24
Tabela 11 - Declaração nutricional e listagem de ingredientes dos dois produtos considerados como alvo.....	34
Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos analisados ao extracto hidrossolúvel de soja	50
Tabela 14 – Valores de viscosidade aparente obtidos da análise de 3 medições efectuadas à formulação SC02 e ao produto alvo Alpro Choco	55
Tabela 15 – Evolução das características organolépticas do produto.....	65
Tabela 16 – Comparação declaração nutricional e listagem de ingredientes, marca de fornecedor (MDF).....	66
Tabela 17 - Comparação declaração nutricional e listagem de ingredientes, marca de distribuidor (MDD)	67
Tabela 18 – Comparação de resultados nutricionais	69
Tabela 19 – Controlo de parâmetros físico-químicos durante período de armazenamento	70
Tabela 20 – Variação de pH durante o processo de fermentação.....	73

Tabela 21 – Resultados dos controlos físico-químicos efectuados em triplicado à 4ª formulação, durante o processo fermentativo	73
Tabela 22 – Adaptação do anexo referido no nº 9 da Portaria nº 742/92 de 24 de Julho...	81
Tabela 23 – Composição nutricional encontrada na <i>Okara</i>	93
Tabela 24 – Teor de isoflavonas da <i>Okara</i> (Bowles and Demiate 2006).....	94
Tabela 25 – Composição típica (%) da lecitina de soja (Nieuwenhuyzen 1976)	96
Tabela 26 - Composição centesimal de formas comerciais de proteínas de soja (Singh et al. 2008).....	97
Tabela 27 – Procedimento implementado para quantificação do teor de proteína.....	119
Tabela 28 – Procedimento implementado para quantificação do teor de gordura	120
Tabela 29 – Procedimento implementado para determinação do teor de humidade e teor de sólidos.....	121
Tabela 30 – Procedimento implementado para quantificação de microrganismos totais.	121
Tabela 31 – Procedimento implementado para quantificação da acidez.....	122
Tabela 32 – Formulações e procedimentos testados.....	123

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Teor de proteína vs Teor de sólidos solúveis	51
Gráfico 2 – Valores de viscosidade em bebidas de soja com cacau	56
Gráfico 3 – Resultados da análise sensorial interna efectuada às duas formulações de bebida de soja original em estudo e ao produto alvo.....	56
Gráfico 4 - Resultados da análise sensorial interna efectuada às duas formulações de bebida de soja com cacau em estudo e ao produto alvo	57
Gráfico 5 – Curvas de fermentação das formulações laboratoriais	72
Gráfico 6 – Variação de acidez durante a fermentação	74
Gráfico 7 - Variação da viscosidade durante o processo fermentativo	74
Gráfico 8 - Contagem de bolores e leveduras em sobremesa fermentada de soja durante período de armazenamento de 32 dias.....	75
Gráfico 9 - Contagem de microrganismos totais em sobremesa fermentada de soja durante período de armazenamento de 32 dias.....	76
Gráfico 10 – Contagem de <i>S.termophilus</i> ao longo do tempo de armazenamento de 32 dias.....	77
Gráfico 11 - Contagem de <i>L. bulgaricus</i> ao longo do tempo de armazenamento de 32 dias	77
Gráfico 12 - Variação de <i>L. bulgaricus</i> versus <i>S.termophilus</i> ao longo do tempo de armazenamento de 32 dias.....	78
Gráfico 13 – Evolução da avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenamento	79

Índice de Anexos

Anexo 1 – Okara	92
Anexo 2 - Outros derivados da soja	96
Anexo 3 - Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos	100
Anexo 4 – Procedimentos analíticos	119
Anexo 5 – Formulações e procedimentos adoptados para produção de sobremesa fermentada de soja	123
Anexo 6 - Análise sensorial interna – Bebida de soja original e Bebida de soja com cacau	126
Anexo 7 - Análise Sensorial	126

Lista de abreviaturas

BBI	Inibidor de tripsina Bowman-Birk
cP	Centipoise
FE	Fitoestrogénios
GDL	Glucono delta-lactona
GOS	Galactooligossacarídeos
HACCP	Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
KTI	Inibidor de tripsina Kunitz
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LOX	Lipoxigenase
MDD	Marca de distribuidor
MDF	Marca de fornecedor
NTIA	Nutre – Indústrias Alimentares S.A.
PCA	Meio de cultura de agar (Plate Count Agar)
RPM	Rotações por minuto
TSP	Proteína de soja texturizada
UFC	Unidades formadoras de colónias
UHT	Temperatura ultra elevada

I. INTRODUÇÃO

1. A história

Ao longo dos tempos o consumidor tem vindo a mudar a sua percepção e posição relativamente à alimentação, sendo exemplo disso as atuais exigências dos consumidores relativamente à produção de alimentos. O consumidor actual preocupa-se não só com as novas tecnologias empregues na transformação de alimentos bem como nos métodos empregues ao nível da produção primária. O ambiente e a sustentabilidade são hoje temas muito atuais e que preocupam o consumidor, hoje mais consciencializado para estas questões.

Por outro lado a saúde e o bem-estar encontram-se no topo da lista das prioridades do consumidor, o aumento da longevidade acarreta outras preocupações e as pessoas passam a olhar para os alimentos de forma mais responsável. O consumidor actual tem noção de que os alimentos contribuem directamente para a sua saúde, considerando pois que, a alimentação não desempenha apenas o papel de satisfazer a fome e fornecer os nutrientes necessários para os seres humanos, estes, esperam que através dela possam prevenir doenças relacionadas com a nutrição e assim melhorar o seu bem-estar físico e mental.

A leguminosa soja reúne em si várias propriedades, quer a nível nutricional e de saúde quer a nível tecnológico. Por ser um alimento com propriedades benéficas para a saúde e por ser uma proteína vegetal extremamente versátil é hoje trabalhada pela indústria nas mais variadas formas.

1.1. NUTRE – Indústrias Alimentares S.A.

A Nutre - Indústrias Alimentares, S.A. foi constituída em 29 de Dezembro de 2010 e é detida a 100% pela Nutre, SGPS, SA. Foi criada com o nome de Prio Foods - Indústrias Alimentares, S.A. e em 31 de Janeiro de 2012 foi alterada a firma para Nutre - Indústrias Alimentares, S.A (**Figura 1**).

A sua sede social é na zona Industrial de Oliveira de Frades, concelho de Oliveira de Frades e a unidade fabril encontra-se instalada na Zona Industrial de Vagos, freguesia e concelho de Vagos. Tem como objecto social: Indústria alimentar, incluindo a transformação de cereais e leguminosas, moagem de cereais, panificação, pastelaria, fabricação de bolachas, biscoitos, tostas e pastelaria de conservação, fabricação de

refeições e pratos pré-cozinhados, de sumos de frutos e de produtos hortícolas e de outros produtos alimentares diversos, não especificados e ainda a indústria de bebidas, compreendendo a fabricação de refrigerantes e de outras bebidas não alcoólicas. A Nutre – Indústrias Alimentares S.A. é o primeiro produtor nacional de produtos de soja, tendo iniciado a sua actividade em 2013. A gama de produtos inclui bebidas de soja, vulgarmente conhecidas por “Leite” de soja, “Iogurtes” de soja e Tofu.



Figura 1 - Unidade fabril da Nutre – Industrias Alimentares, S.A.

1.2. A Soja



Figura 2 – Grão de soja

A soja (**Figura 2**) tem uma longa e significativa história, pertence à ordem das *Rosaceae*, enquadra-se na família das *Leguminosae* ou *Papilionaceae* ou *Fabaceae*, sub-família *Papilionoidae*, género *Glycine* e espécie *Glycine max* (**Mateos-Aparicio et al. 2008**). É originária da China, onde é cultivada há mais de 5000 anos (**He and Chen 2013**) e com a introdução das rotas comerciais por mar e terra na Ásia, a soja chegou ao Sudeste da Ásia.

Foi introduzida na Europa no século XVIII (**He and Chen 2013**), mais concretamente no ano de 1712 pelo botânico alemão Engelbert Kaempfer, mas as condições climatéricas e o solo inadequados inviabilizaram o cultivo desta planta.

Posteriormente foi Carl von Linné que deu o nome à soja de *Glycine max* (**Mateos-Aparicio et al. 2008**).

1.2.1. COMPOSIÇÃO

A soja é constituída por macronutrientes essenciais ao ser humano, nomeadamente, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, fibra e micronutrientes, tais como, isoflavonas, vitaminas, saponinas e minerais (**Cederroth and Nef 2009**). Na **Tabela 1**, é possível ver a composição do grão de soja de forma mais pormenorizada.

Tabela 1 - Composição do grão de soja expressa em g por 100g em base seca (**Mateos-Aparicio et al. 2008**)

Composição	Grão de soja
Hidratos de carbono (g)	21
Açúcares	9
Estaquinose (mg)	3,3
Rafinose (mg)	1,6
Proteína (g)	36
Lípidos (g)	19
Saturados (g)	2.8
Monosaturados (g)	4.4
Polinsaturados (g)	11.2
Fibra insolúvel (g)	10
Fibra solúvel (g)	7
Cálcio (mg)	276
Magnésio (mg)	280
Potássio (mg)	1,80
Ferro (mg)	16
Zinco (mg)	4.8

1.2.1.1. Proteína

As proteínas de soja são talvez as proteínas mais utilizadas pela indústria alimentar, pois reúnem em si excelentes características tecnológicas, funcionais e nutricionais. Em termos nutricionais, a proteína de soja possui um dos melhores padrões de aminoácidos essenciais (**Tabela 2**), com exceção dos aminoácidos sulfurados (metionina, cisteína e treonina), para os quais apresenta baixos teores, contudo, esta diferença entre proteína de soja e proteína de origem animal não é significativa, pelo que se considera que a proteína de soja apresenta uma qualidade equivalente à proteína de origem animal (**Mateos-Aparicio et al. 2008**).

Tabela 2 – Composição em aminoácidos do grão de soja (**Mateos-Aparicio et al. 2008**)

Aminoácido	mg/g de proteína
Arginina	77.16
Alanina	40.23
Ácido aspártico	68.86
Cisteína	25.00
Ácido Glutâmico	190.16
Glicina	36.72
Histidina	34.38
4-Hydroxiprolina	1.40
Isoleucina	51.58
Leucina	81.69
Lisina	68.37
Metionina	10.70
Fenilalanina	56.29
Prolina	52.91
Serina	54.05
Treonina	41.94
Triptofano	12.73
Tirosina	41.55
Valina	41.55
Arginina	77.16

Com base nas suas funções biológicas as proteínas de soja podem classificar-se como: metabólicas e de reserva. As de reserva são maioritariamente globulinas e representam cerca de 90% do total de proteínas no grão, as metabólicas incluem enzimas intracelulares (lipoxigenase, urease, amylase), hemaglutininas, inibidores proteicos e lipoproteínas (**Kinsella 1979**).

A caracterização das diferentes proteínas que constituem o grão de soja inicia-se com o processo de extração das mesmas, sendo que, cerca de 90% podem ser extraídas com água e soluções salinas. Após extração, as proteínas de soja são submetidas a ultracentrifugação, podendo ser divididas em quatro fracções de acordo com a sua velocidade de sedimentação 2S, 7S, 11S e 15S, e onde “S” é a unidade Sverberg (**Fennema 1996**). Contudo, a classificação baseada na velocidade de sedimentação serve apenas o propósito de identificar e classificar, pois os padrões de separação das diferentes fracções dependem de factores como a composição do padrão, pH do meio e outros factores (**Guo 2013**). Na **Tabela 3** é possível verificar a correspondência entre as várias fracções proteicas que constituem o grão de soja e a sua quantidade relativa (%) no grão de soja, bem como os vários componentes que as constituem.

Tabela 3 - Fracções proteicas do grão de soja (**deMan 2013**)

Fracção	Quantidade relativa (%)	Componentes	Massa molecular (kDa)
2S (α -conglícinina)	22	Inibidores de tripsina Citocromo C	8 - 21.5 12
7S (β e γ -conglícinina)	37	Hemaglutininas Lipoxigenases β -amilase Globulina 7S	110 102 61.7 180-210
11S (glicínina)	31	Globulina 11S	350
15S	11		600

A fracção 2S corresponde a 22 % das proteínas extraídas com água e é composta principalmente por inibidores de tripsina, enquanto a fracção 7S corresponde a 37 % das proteínas extraídas em água e contém hemaglutininas, lipoxigenases, β -amilase e globulinas 7S.

Quanto à fracção 11S, esta corresponde a 31 % das proteínas extraídas com água, e é composta pela globulina 11S enquanto a fracção 15S corresponde a 11 % das proteínas extraídas com água (**Wolf and Nelsen 1996**).

Os dois principais componentes das proteínas de reserva são a glicínina (11S) e a β -conglícinina (7S) (**Chen et al. 2013**), representando cerca de 40% e 30% respectivamente do total de proteínas que constituem o grão de soja (**Mujoo et al. 2003**) e são os principais responsáveis pelas propriedades nutricionais e físico-químicas da soja (**Natarajan et al. 2006**).

β – conglícinina (7S)

A β -conglícinina é uma globulina 7S pertencente à família das vicilinas, representa cerca de 90% do total da fracção 7S e caracteriza-se por ser uma glicoproteína trimérica com peso molecular médio de 181.000Da, é constituída por três subunidades, α' (57-72 kDa), α (57-68 kDa), e β (45-52 kDa), associadas em sete combinações ($\beta\beta\beta$, $\beta\beta\alpha'$, $\beta\beta\alpha$, $\beta\alpha\alpha'$, $\beta\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha'$, e $\alpha\alpha\alpha$) (**Renkema 2001**). Estas subunidades estão associadas por

interacções hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, e sem quaisquer ligações dissulfureto. A pH 5 e superior, a β -conglucina é um trímero (7S) a uma força iónica de 0,5 M, ao passo que existe predominantemente como um hexâmero (9S) a uma força iónica inferior a 0,1 M e na zona intermédia de força iónica, estão presentes quantidades variáveis de 7S e 9S β -conglucina.

A um pH de 2-5, a β -conglucina dissocia-se reversivelmente numa fracção 2-3S e 5-6S a força iónica inferior a 0,1 (Wolf 1972). O ponto isoeléctrico de β -conglucina é 4,64 (Koshiyama 1983).

As subunidades α , α' e β são ricas em asparagina, glutamina, leucina e arginina, sendo as subunidades α e α' ricas também em cisteína, mas pobres em metionina. A subunidade β não apresenta metionina (Liu 1997).

Glicinina (11S)

A glicinina é uma globulina 11S pertencente à família das leguminas (Natarajan et al. 2006), apresenta uma estrutura hexamérica constituída por 2 polipeptídeos unidos por uma ligação dissulfeto. Os polipeptídeos apresentam uma estrutura A-B (em que: A representa o polipeptídeo ácido de 33-44 kDa; B - polipeptídeo básico de 20 kDa).

Pelo menos seis polipeptídeos ácidos ($A_{1,a}$, $A_{1,b}$, A_2 - A_4 , e A_5) e cinco polipeptídeos básicos ($B_{1,a}$, $B_{1,b}$, B_2 - B_4) foram já isolados. À temperatura ambiente e a pH 7,6 a glicinina forma hexâmeros (11S) de massa molecular 360 kDa, enquanto, a pH 3,8 encontra-se sobretudo na forma de trímeros (7S) com massa molecular aproximada de 180kDa. Com uma diminuição da força iónica de 0,5 M para valores inferiores a 0,1 M também é possível induzir a dissociação das globulinas 11S em 7S. O ponto isoeléctrico da glicinina é 4,90 (Renkema 2001).

Propriedades das proteínas maioritárias da soja

Em geral, a fracção 11S contém 3 a 4 vezes mais metionina e cisteína do que a fracção 7S, assim sendo, a fracção 11S torna-se mais valiosa do ponto de vista nutricional pelo facto de, na globalidade as proteínas de soja serem deficientes nestes dois aminoácidos. Existem ainda consideráveis diferenças entre as duas fracções no que respeita a propriedades funcionais chave, tais como, capacidade gelificante, estabilidade térmica e

capacidade emulsificante, enquanto a glicinina (11S) tem uma maior capacidade gelificante, a conglicinina (7S) apresenta maior capacidade emulsificante e de estabilização das emulsões.

Ambas formam géis induzidos por calor e/ou por agentes coagulantes (como por exemplo, glucono delta-lactona (GDL) ou sulfato de cálcio), quando aquecidas a cerca de 80°C durante 30 minutos. A fracção 7S forma géis mais duros que a 11S, contudo a temperatura de desnaturação da 7S é inferior à da 11S (**Guo 2013**).

O aquecimento provoca dissociação da fracção 11S em sub-unidades que se agregam lentamente até à temperatura de 70°C mas precipitam rapidamente a 90°C, pelo que, as subunidades da fracção 11S são mais lábeis ao calor.

Alguns solventes orgânicos e em particular misturas aquosas de álcoois de baixo peso molecular, também provocam desnaturação rápida das proteínas de soja.

Em meio alcalino a glicinina sofre clivagem das ligações dissulfeto (em maior número do que na 7S), resultando num aumento de viscosidade e eventual gelificação. Ao contrário das globulinas 7S, as globulinas 11S são estabilizadas contra a agregação térmica até 80°C, por soluções de alta força iónica (**Kinsella 1979b**).

Na **Tabela 4** abaixo é possível verificar de forma sumária as alterações provocadas pela temperatura nas propriedades físicas das globulinas da soja.

Tabela 4 – Efeito da temperatura sobre algumas propriedades físicas das proteínas de soja (**Kinsella 1979b**)

Propriedade	Temperatura (°C)				
	80	100	120	140	160
Estrutura da subunidade	Dissociação			Degradação	
Solubilidade	Diminui-precipitação		-----	Aumento solubilidade	
Viscosidade	Aumenta---diminui		-----	Diminui	
Hidratação	Aumenta-----		Diminui		
Gelificante	Regular-----Duro-frágil		-----	Suave, elástico-----Sol	

Em suma, as proteínas de soja apresentam excelentes propriedades funcionais aliadas a alto valor nutricional, abundância, disponibilidade e baixo custo, constituindo-se

assim como um ingrediente extremamente relevante e largamente utilizado nos mais variados produtos alimentares.

Na **Tabela 5** é possível verificar a relação entre as diferentes propriedades funcionais das proteínas de soja, o modo de ação e a aplicação das mesmas em diferentes alimentos.

Tabela 5 – Propriedades funcionais das proteínas de soja em diferentes alimentos (Jooyandeh 2011)

Propriedade funcional	Modo de acção	Alimentos	Produto de soja
			F: Farinha de soja; C: Concentrado de soja; I: Isolado de soja; H: hidrolisado de soja; W: “soro” de soja
Solubilidade	Solvatação de proteína, pH dependente	Bebidas	F, C, I, H
Absorção de água	Formação de pontes de hidrogénio, aprisionamento da água	Carne, salsichas, pães, bolos	F, C
Viscosidade	Retenção da água	Sopas, molhos	F, C, I
Gelificante	Formação de matriz proteica	Carne, queijo, coalhada	C, I
Coesividade-adesividade	Proteína actua como adesivo	Carne, salsichas, produtos pastelaria, pasta	F, C, I
Elasticidade	Formação de ligações dissulfureto em géis deformáveis	Carne, produtos de pastelaria	I
Emulsionante	Formação e estabilização de emulsões	Salsichas, sopas, bolos	F, C, I
Absorção de gordura	Retenção de gordura livre	Carne, salsichas, rosquilhas	F, C, I
Retenção de aroma	Adsorção, aprisionamento	Carnes análogas, produtos padaria e pastelaria	C, I, H
Formação de Espuma	Formação de filmes para aprisionamento de ar	Coberturas (batidas), sobremesas	I, W, H
Controlo de cor	Branqueamento (Lipoxygenase)	Pães	F

Em termos de benefícios para a saúde, a ingestão de proteína de soja em vez de proteína animal diminui significativamente as concentrações de colesterol total, colesterol LDL e triglicérideos (He and Chen 2013).

1.2.1.2. Lípidos

A maioria das leguminosas têm um baixo teor em gordura, geralmente contendo <5% de energia proveniente da gordura, as exceções são o grão-de-bico e a soja.

O grão de soja é constituído por cerca de 18-22% de óleo, e a fracção de gordura contém principalmente triglicerídeos que representam 99% do teor total de lípidos presentes no grão de soja. Os componentes minoritários incluem fosfolípidos, insaponificáveis (tocoferóis, fitoesteróis e hidratos de carbono), e ácidos gordos. Os tocoferóis são excelentes antioxidantes naturais, e embora em quantidades vestigiais (mg/Kg) os grãos de soja contêm α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, e δ -tocoferol (**Dixit et al. 2011**). A **Figura 3** apresenta esquematicamente a composição lipídica do grão de soja.

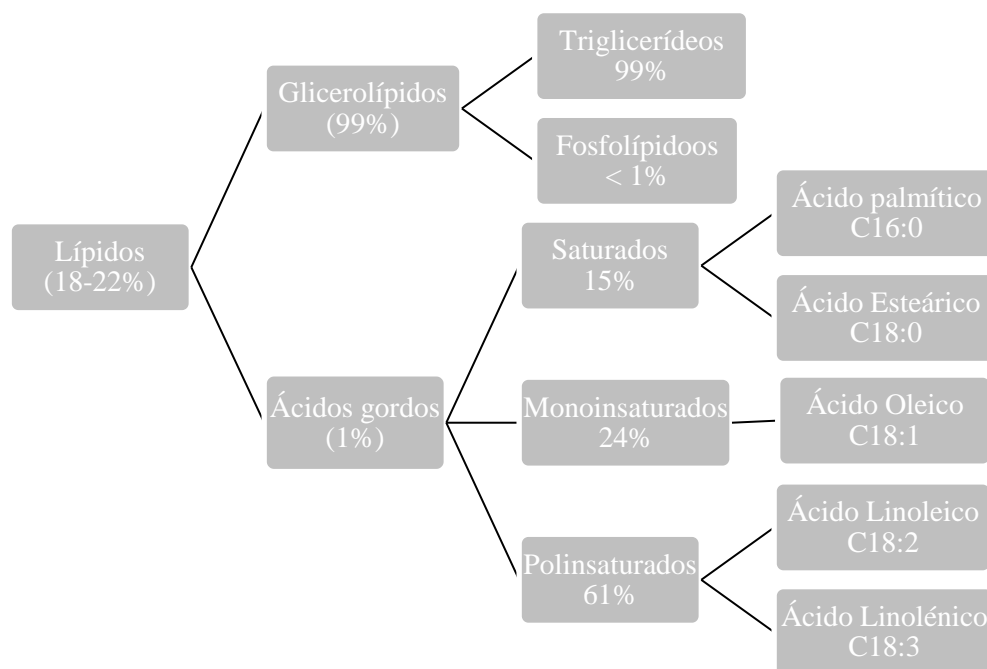


Figura 3 - Conteúdo em lípidos da semente de soja (**Cederroth and Nef 2009**)

Destaca-se o alto teor em ácidos gordos mono e polinsaturados, 24% e 61% respetivamente (**Jooyandeh 2011**). Assim sendo, a soja além de ser uma excelente fonte de vitamina E, é também uma das poucas fontes vegetais de ácidos gordos Ómega 6 e Ómega 3 (**Jooyandeh 2011**), uma vez que ácido linoleico representa cerca de 53% do total de ácidos gordos presentes no grão de soja, e o teor de ácido linolénico (ω 3) representa entre

7 a 8% do valor total de ácidos gordos que constituem o grão de soja (**Mateos-Aparicio et al. 2008**).

Os ácidos gordos Ómega 3 e Ómega 6 são ácidos gordos essenciais, o que significa que não são sintetizados pelo corpo humano, desempenham papéis relevantes em termos nutricionais e fisiológicos, sendo por este motivo muito importante ingeri-los através da dieta ou em forma de suplementos (**Asif 2011**).

1.2.1.3. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são o segundo maior componente do grão de soja, correspondendo a 35% dos compostos da semente de soja (**Mateos-Aparicio et al. 2008**). Cerca de 50% desse valor corresponde a polissacarídeos, nomeadamente, celulose, hemicelulose, pectina, ou seja, fibras (**Cederroth and Nef 2009**), os restantes 50%, referem-se a açúcares solúveis, principalmente, sacarose (2,5 - 8,2%), rafinose (0,1 - 0,9%), estaquiose (1,4 - 4,1%) e vestígios de outros monossacarídeos, tais como frutose, ramnose e arabinose (**Rupérez 2006a**) (**Figura 4**).

A presença de galactanas, estaquiose e rafinose na constituição do grão soja fazem dele uma fonte de galactooligosacarídeos (GOS) (**Min 2008**), não digeríveis e que estão presentes em vários alimentos e leguminosas (**Rupérez 2006b**).

A rafinose é um trissacarídeo ou triose (α -D-galactopiranosídeo (1-6)- α -D-glucopiranosídeo-(1-2)- β -D-fructofuranosídeo) constituído por uma unidade de galactose α - ligada (1-6) ao glucosídeo que constitui a molécula de sacarose; por sua vez a estaquiose é um tetrassacarídeo ou tetraose que contém uma molécula de galactose ligada α (1-6) à unidade terminal de galactose que constitui a rafinose.

Devido à ausência da enzima α -galactosidase (α -GAL) no trato intestinal do ser humano estes oligossacarídeos não conseguem ser devidamente hidrolisados e por conseguinte são metabolizados pela flora intestinal no intestino grosso, provocando flatulência e desconforto abdominal (**Min 2008**).

Contudo, segundo (**Bedani et al. 2013**) a bebida de soja pode ser considerada um bom meio para o crescimento de *Bifidobacterium spp* devido à presença de rafinose e estaquiose, que são fermentados pela maioria das estirpes pertencentes a este género. Assim, e de acordo com o exposto anteriormente, podemos dizer que apesar dos principais

atributos da soja se prenderem principalmente com o teor e qualidade das suas proteínas e óleo, a soja é também uma fonte de fibra dietética (**Redondo-Cuenca et al. 2008**).

A importância da fibra, prende-se com o seu considerável potencial prebiótico, isto é, afecta benéficamente o crescimento e/ou actividade das bifidobactérias, que desempenham um papel importante na defesa contra agentes patogénicos. Este efeito prebiótico advém do processo de fermentação, onde são produzidos ácidos gordos de cadeia curta, principalmente acetato, propionato e butirato, compostos estes associados a vários benefícios de saúde (**Mateos-Aparicio et al. 2010**).

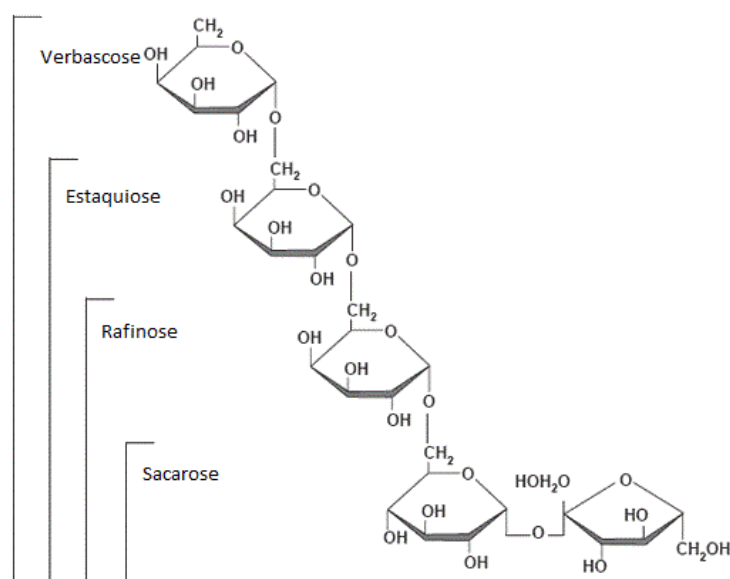


Figura 4 – Estrutura química da Rafinose, Estaquiiose e Verbascose (**Min 2008**)

1.2.1.4. Vitaminas

A soja além do alto valor nutritivo e da grande relevância que tem na alimentação humana enquanto fonte de energia e proteína é também uma razoável fonte de vitaminas e minerais (**Dutra de Oliveira et al., 1966**). O grão de soja quando ainda verde apresenta alto teor de niacina e de ácido ascórbico, quando maduro apresenta-se como uma excelente fonte das vitaminas E e K e boa fonte de tiamina, riboflavina e ácido fólico. Na **Tabela 6** é possível ver o teor de vitaminas presentes em farinha desengordurada de soja.

Tabela 6 – Vitaminas presentes em farinha desengordurada de soja (**MacLeod and Ames 1988**)

Composição	Teor
Vitamina A	0,7 – 4 IU
Tiamina B1 (mg/ 100g)	1 – 1,5
Riboflavina B2 (mg/ 100g)	0,24 – 0,44
Niacina B3 (mg/ 100g)	4,09 – 1,20
Vitamina B6 (mg/ 100g)	0,48 – 1,20
Ácido Fólico B9 (mg/ 100g)	0,03 – 0,09
Cobalamina B12 (mg/ 100g)	0,06 – 0,20
Biotina B7 (mg/ 100g)	0,17 – 0,66
Ácido pantoténico B5 (mg/ 100g)	1,3 – 5,1
Colina	2,2 – 3,8
Vitamina C	0
Vitamina D	0
Vitamina E	1,5 IU

1.2.1.5. Minerais

É possível encontrar minerais e outros elementos químicos na constituição do grão de soja, conforme se pode verificar na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Conteúdo mineral dos grãos de soja (**MacLeod and Ames 1988**)

Principais minerais e elementos químicos (0,2% - 2,1%)	Potássio, Fósforo, Magnésio, Enxofre, Cálcio, Cloreto, Sódio
Minerais e elementos químicos minoritários (0,01ppm – 140ppm)	Silício, Ferro, Zinco, Cobre, Manganês, Molibdénio, Flúor, Crómio, Selénio, Cobalto, Cadmio, Iodo Chumbo, Arsénio, Mercúrio

De todos estes minerais e elementos químicos, os que apresentam teores mais significativos são, o ferro (4,42 mg/90g de grão de soja), zinco (0,99 mg/90g de grão de soja) e cálcio (138mg/90g de grão de soja) (**García et al. 1997**).

A biodisponibilidade do cálcio a partir de grãos de soja, é geralmente inferior a 20%, ou seja, menor do que a do leite e vegetais de folhas verdes, mas ainda assim é considerado razoável. A biodisponibilidade de cálcio a partir da soja e seus produtos é equivalente à biodisponibilidade a partir do leite, no entanto, a soja tem um elevado teor

em fitato (ácido fítico) e oxalato (ácido oxálico) (**Messina 1999**), substâncias que podem bloquear a absorção de minerais essenciais como cálcio, magnésio, ferro, cobre e zinco no tracto intestinal (**Jooyandeh 2011**).

1.2.1.6. Fitoestrogénios

Os fitoestrogénios são compostos vegetais polifenólicos, não-esteróides, capazes de exercer efeitos estrogénicos. Fazem parte desta família as flavonas (kaempferol e quercitina) (**Figura 5A**), isoflavonas (genisteína, daidzeína, formonectina e equol) (**Figura 5B**), lignanas (enterolactona, enterodiol e ácido nordihidroguaiarético), coumestanos (coumestrol) (**Figura 5C**), micotoxinas (zearalenol) e estilbenos (resveratrol) (**Figura 5D**) (**Zhao and Mu 2011**).

As lignanas, são constituintes da parede celular das plantas e encontram-se em muitos alimentos ricos em fibras, tais como frutas, sementes de linhaça (em particular), grãos, nozes e frutas, contudo, as isoflavonas e coumestanos são os grupos mais amplamente estudados.

Os coumestanos pertencem à família das *Fabaceae* e os principais coumestanos com efeito fitoestrogénico são: o coumesterol e o 4'-metoxi-coumestrol (**Figura 5C**) (**Prakash and Sharma 2014**).

As isoflavonas estão presentes em frutas, vinho, grãos e nozes, mas são mais abundantes na soja e outras leguminosas (**Patisaul and Jefferson 2010**). A característica estrutural básica das isoflavonas é o núcleo de flavona, que é composto por dois anéis de benzeno ligados através de um anel heterocíclico pirano (**Figura 5B**) (**Banerjee et al. 2008**). São substâncias sem efeito nutritivo relacionadas com vários benefícios à saúde, nomeadamente, prevenção de doenças crónicas, tais como doença cardíaca, cancro, diabetes e hipertensão, bem como outras patologias clínicas (**Mateos-Aparicio et al. 2008**).

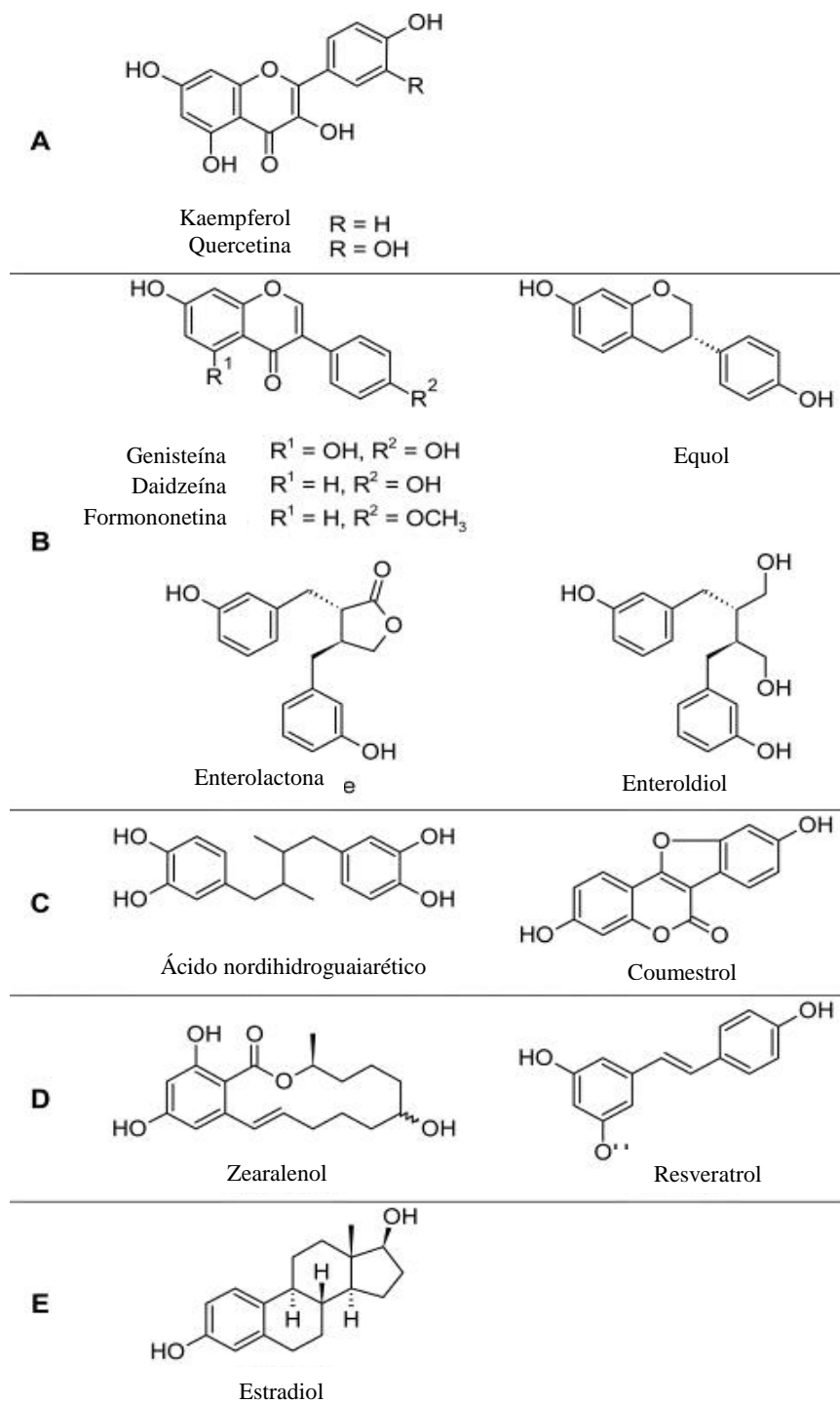


Figura 5 – Estrutura de vários fitoestrogénios (Zhao and Mu 2011)

1.2.1.6.1. Isoflavonas

A daidzina, a genistina e a glicitina são os três glucosídeos de isoflavonas presentes no grão de soja e produtos derivados. Podem encontrar-se na forma não conjugada de β -

glucosídeos e na forma conjugada malonil- ou acetil- β -glucosídeos (**Figura 6**). As formas de isoflavonas presentes no grão de soja dependem da variedade, do ano de colheita e localização geográfica.

Regra geral, no grão de soja as formas predominantes são a malonil-daidzina e a genistina, que em conjunto, constituem 71 a 81% do total de isoflavonas (**Jung et al. 2008**). Estas formas de glucosídeos são biologicamente inativas.

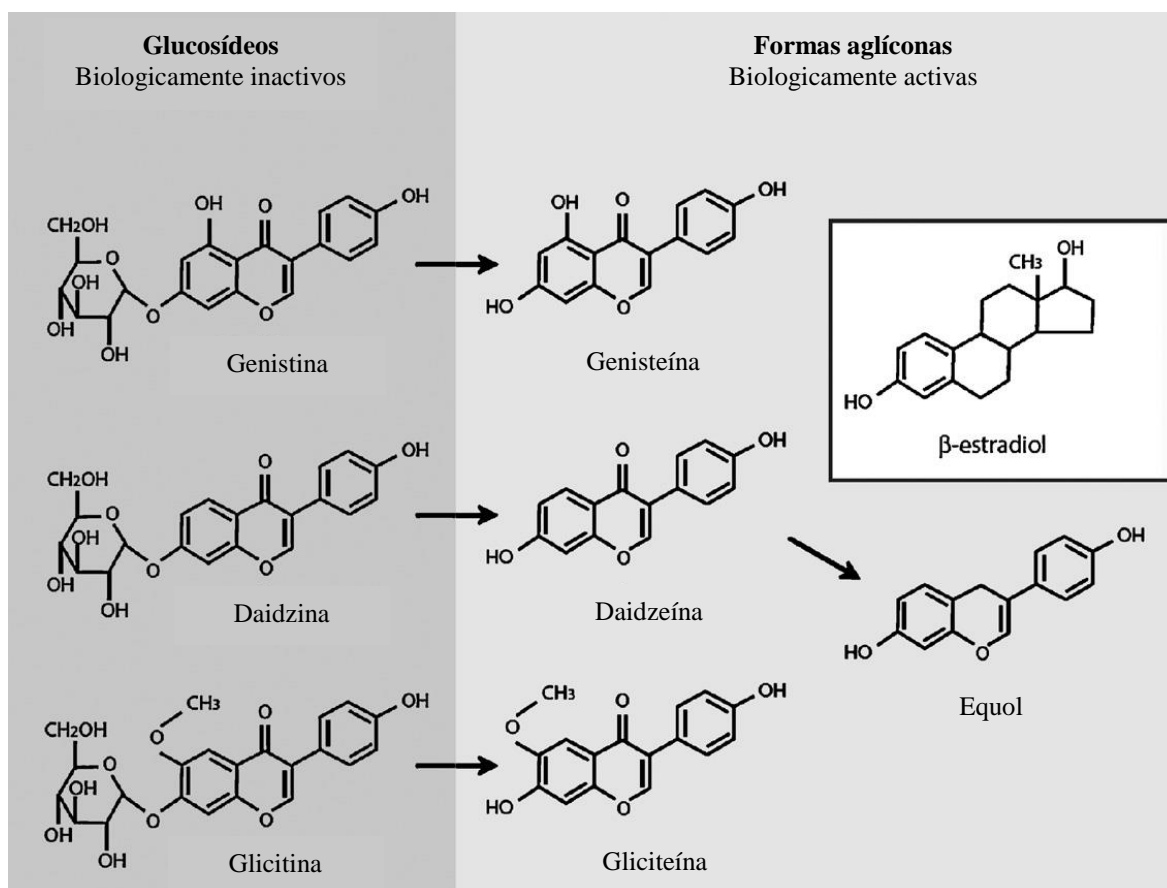


Figura 6 – Estrutura molecular das isoflavonas e do 17- β -estradiol (**Cederroth and Nef 2009**)

Uma vez ingeridos, os β -D-glucosídeos são hidrolisados por β -glucosidases bacterianas presentes na parede intestinal, convertendo-se nas correspondentes agliconas bioativas (genisteína e daidzeína). Apenas as formas agliconas são absorvidas pelo trato intestinal e são portanto, biologicamente activas. A daidzeína pode ser posteriormente metabolizada a equol e *O*-demethyangolensina, genisteína e a *p*-etilfenol. A genisteína, daidzeína, equol e *O*-demethyangolensina são as isoflavonas principais detectadas no sangue e na urina de seres humanos e animais (**Cederroth and Nef 2009**).

1.2.1.6.1.1. Genisteína

A genisteína é a mais estudada das isoflavonas e tem sido demonstrado que tem múltiplas actividades biológicas, tais como inibição das topoisomerasas II, inibição da actividade da tirosina-quinase que resulta na morte de células cancerígenas (**Allred 2001**). Por outro lado, devido à sua semelhança estrutural com o 17- β -estradiol, tem vindo a ser demonstrado que a genisteína compete com o 17- β -estradiol em ensaios de ligação aos receptores de estrogénio. Assim, por interacção com o receptor de estrogénio, a genisteína bloqueia a ligação de estrogénios mais potentes afectando o metabolismo do estrogénio, exercendo desta forma um papel favorável na prevenção de cancros relacionados com hormonas (**Banerjee et al. 2008**).

2. Benefícios do consumo de soja e seus derivados

2.1. Nutricionais

Na sequência do exposto anteriormente podemos dizer que a incorporação da soja na dieta humana tem vindo a aumentar fruto das suas características nutricionais, tais como, proteínas de alta qualidade, ácidos gordos polinsaturados e fibras (**Bedani et al. 2014**).

As fibras que constituem a semente de soja apresentam boas propriedades nutricionais e funcionais, que associadas a um sabor neutro e a ausência de cor tornam-nas adequadas para incorporação em produtos alimentares (**Redondo-Cuenca et al. 2008**).

2.2. Saúde

Para além das excelentes características nutricionais e funcionais da soja, esta desempenha também um importante papel ao nível da saúde, nomeadamente, na redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, cancro, e osteoporose (**Chen et al. 2013**).

Na **Tabela 8** pretende-se resumir as principais funções fisiológicas associadas às principais proteínas de soja, a glicinina (11S) e a β -conglucina (7S), e aos constituintes minoritários do grão de soja.

Tabela 8 – Funções fisiológicas associadas às principais proteínas de soja e aos constituintes minoritários (Jooyandeh 2011)

Componentes	Funções fisiológicas
Proteínas	Redução colesterol, prevenção de doenças cardiovasculares, redução de gordura corporal
Peptídeos	Actividade antioxidante, inibição de enzimas de conversão da angiotensina e promoção da acção de fagocitose
Isoflavonas	Actividade anti-carcinogénica, prevenção de doenças cardiovasculares, prevenção da osteoporose, actividade antioxidante e alívio de sintomas associados à menopausa
Saponinas	Actividade anti-carcinogénica, efeitos hipocolesterolémicos, inibição da agregação de plaquetas, prevenção dos efeitos do HIV, actividade antioxidante.
Fitosterol	Actividade anti-carcinogénica
Ácido fítico	Actividade anti-carcinogénica
Lecitina (hemaglutinina)	Activação de linfócitos (Tcell) e acção de agregação de células tumorais
Nicotinamida	Inibição de enzimas de conversão da angiotensina
Inibidores da protease	Actividade anti-carcinogénica

3. Processo produtivo - Evolução

Ao longo dos tempos a soja tem vindo a ser transformada e utilizada em vários tipos de alimentos graças à sua versatilidade, obtendo-se produtos saborosos e de fácil digestão. A produção de uma quantidade significativa destes produtos é produzida a partir do extracto hidrossolúvel de soja.

Para obter o extracto hidrossolúvel de soja, no ano de 1967, Wilkens, Mattick, e Hand desenvolveram o “processo Cornell”, e mais tarde em 1976 Nelson, Steinberg e Wei desenvolveram o “processo Illinois”. Estes métodos convencionais de manufactura do

“leite” de soja, envolvem etapas como imersão, moagem, filtração e cozedura do grão de soja (Prabhakaran and Perera 2006).

Na **Figura 7** é possível ver um esquema com os diferentes métodos de produção de “leite” de soja, bem como algumas diferenças no que respeita a características sensoriais e proteína extraída.

Processo	Tradicional	Cornell	Illinois	RHHC (rapid hydration, hydrothermal cooking)	ProSoya
	Grão de soja limpo ↓ Imersão ↓ Moagem a frio ↓ Cozedura (100°C/ 20 min) ↓ Filtração	Grão de soja limpo ↓ Imersão ↓ Moagem a quente ↓ Cozedura (100°C/10 min) ↓ Filtração	Grão de soja limpo ou descascado ↓ Imersão em meio alcalino ↓ Branqueamento (100°C, 10-20 min) ↓ Moagem ↓ Cozedura a 82°C ↓ Homogenização	Grão de soja limpo ↓ Moer até obter farinha ↓ Pasta em água ↓ Cozedura (154°C, 30s) ↓ Arrefecimento ↓ Filtração	Grão de soja limpo ↓ Imersão durante a noite ↓ Moagem a frio em água sem oxigénio ↓ Cozedura (100°C, 10-20 min.) ↓ Filtração
Sabor a “beany”	Forte	Moderado	Nenhum	Nenhum	Nenhum
% Sólidos	61% (55-65%)	65%	89%	86%	75%
Rendimento em proteína	73% (70-80%)	83%	95%	90%	80%

Figura 7 – Métodos de produção de bebida de soja (Golbitz 1995)

3.1. Factor anti-nutricional

É facto que os produtos de soja estão fortemente conotados com as suas propriedades funcionais e nutricionais, contudo, o seu consumo é muitas vezes limitado devido aos sabores indesejáveis característicos a “verde” ou a feijão cru e também ao facto de conter factores anti-nutricionais, que provocam uma diminuição da digestibilidade de proteínas e consequente valor nutricional para além de provocar hipertrofia do pâncreas (van der Ven et al. 2005).

Este efeito prejudicial é devido aos inibidores da tripsina, lectinas e à estrutura compacta das formas nativas das principais proteínas de reserva da soja, a β -conglucina e a glicina. Os inibidores de tripsina da soja são de dois tipos: o inibidor da tripsina Kunitz (KTI) e o inibidor Bowman-Birk (BBI), o qual é também um inibidor de quimotripsina, e a principal forma de inibidores de tripsina presente em leite de soja que já sofreu tratamento térmico (Yuan et al. 2008).

Ambos os inibidores são bastante estáveis ao calor, facto explicado pela presença de várias pontes de dissulfureto, nomeadamente, duas no inibidor KTI e sete no inibidor BBI (van der Ven et al. 2005). As temperaturas e tempos requeridos para inactivar 90% do total de inibidores de tripsina, a um pH de 6,5 situam-se na ordem dos 143°C e 154°C (gama to tratamento de UHT – Temperatura Ultra Elevada) durante 62 s e 29 s respectivamente (Kwok et al. 2002). Este tratamento térmico permite preservar cerca de 90% da tiamina presente no “leite” de soja e minimizar a deterioração sensorial (que ocorreria em tratamentos térmicos mais longos a temperaturas mais baixas) (van der Ven et al. 2005).

O facto de não ser efectuada uma inactivação de 100% dos inibidores de tripsina, é explicado por (Hackler et al. 1965). Este autor defende que manter 4-10% de actividade residual dos inibidores de tripsina potencia um maior valor nutritivo em termos de proteína no “leite” de soja termicamente tratado, por outro lado, uma inactivação de inibidores de tripsina a 100%, necessitaria de um tratamento térmico muito mais intenso o que provocaria danos nas proteínas pela destruição dos aminoácidos, lisina, triptofano e cisteína. E como referido anteriormente, a retenção de cisteína é muito importante para manter o valor nutritivo da proteína de soja, pois é um dos dois aminoácidos essenciais sulfurados e por outro lado a destruição da cisteína também contribui para o aparecimento de sabores desagradáveis no “leite” de soja (Yuan et al. 2008).

3.2. Oxidação lipídica

A enzima lipoxigenase potencia a oxidação lipídica, e também está relacionada com sabores e odores estranhos associados aos produtos de soja. Estes sabores e odores estão relacionados com vários compostos voláteis e não voláteis. Esses compostos voláteis, dizem respeito a aldeídos, álcoois, cetonas e furanos, enquanto, os não voláteis conferem

amargura e adstringência e devem-se a isoflavonas, ácido fenólico, saponinas, tetrol e outras substâncias. No “leite” de soja e outros derivados de soja o sabor característico a verde ou grão cru é principalmente devido à lipoxigenase ou à rancidez oxidativa dos ácidos gordos insaturados.

Nas plantas os lípidos são sequencialmente degradados em compostos voláteis e não-voláteis por uma série de enzimas através da via da lipoxigenase, que catalisa a hidroperoxidação de ácidos gordos polinsaturados numa estrutura de 1,4-cis-pentadieno para formar aldeídos de cadeia média e álcoois que são responsáveis pelo sabor gramíneo-*beany*. Estes compostos são bastante difíceis de eliminar pelo facto de possuírem uma grande afinidade com a proteína de soja, por outro lado, as características sensoriais do “leite” de soja também dependem doutros factores, tais como, genótipo das cultivares de soja utilizadas para a produção, condições ambientais e método de processamento (**Ma et al. 2014**).

Com os diferentes avanços tecnológicos foram feitas várias modificações e melhorias ao processo de produção do extracto hidrossolúvel de soja, de forma a dar resposta aos requisitos sensoriais do consumidor. Uma das alterações mais significativas prende-se com o tratamento térmico aplicado ao produto ao longo das diferentes etapas do processo. Com o aparecimento da tecnologia UHT, tornou-se possível produzir em larga escala e de forma contínua, tendo a alta temperatura e tempos curtos substituído as baixas temperaturas e processos térmicos prolongados aplicados nos processos convencionais, obtendo-se assim produtos com validade prolongada embalados em embalagens assépticas (**Prabhakaran and Perera 2006**).

3.3. Sub-produto – *Okara*

Aquando do processo de extracção do extracto hidrossolúvel de soja é obtido o sub-produto denominado de *Okara* (palavra japonesa), mas com outras denominações em diferentes países (**Noguchi 1987**). Cerca de 1,1 kg de *Okara* fresca é produzido a partir de cada quilograma de matéria-prima processada para obter “leite” de soja (**Khare et al. 1995**). Alguns estudos têm sugerido que a *Okara*, pode ser utilizada na indústria alimentar para conferir aumento das propriedades nutricionais e funcionais em produtos alimentares (**Bedani et al. 2014**).

Em alguns países, a *Okara* ainda não foi reconhecida como subproduto e continua a ser tratada como resíduo. No Japão é queimada como resíduo (Ohno et al. 1993) e em Hong Kong é despejada em aterros sanitários. No entanto, alguns centros de investigação têm realizado análises a este subproduto com o objectivo de o conhecer e o utilizar no desenvolvimento de alimentos processados para consumo humano e animal.

Após a caracterização físico-química da *Okara*, a denominação de subproduto pode ser adoptada como mais apropriada do que a de resíduo, pois os valores das proteínas e em especial os valores das fibras apresentam-se favoráveis do ponto de vista nutricional. Segundo os resultados das análises microbiológicas, a *Okara* pode ser utilizada como ingrediente ou como suplemento alimentar (Bowles and Demiate 2006).

A utilização da *Okara* na alimentação humana é restringida pelo seu alto teor em fibras (Toole 1999) o que a torna um produto extremamente hidrofílico, isto é, com elevada capacidade de retenção de água e por isso de difícil secagem. Por outro lado, trata-se de um produto altamente fermentescível devido à elevada actividade da água, pelo que a sua conservação deverá ser o mais rápida e eficiente possível, isto é, imediatamente após a sua obtenção. Assim sendo, e muito embora seja um produto nutricionalmente apelativo, o seu processamento/conservação e posterior utilização à escala industrial e de forma economicamente viável é ainda um desafio. Da análise bibliográfica efectuada foi possível constatar um grande interesse no estudo da viabilidade da utilização da *Okara* enquanto ingrediente alimentar, bem como, os esforços e avanços conseguidos no que respeita à conservação da mesma.

3.3.1. Composição da soja versus *Okara*

3.3.1.1. Caracterização físico-química

Os resultados da composição dos grãos de soja, do extracto aquoso e da *Okara* encontram-se representados na **Tabela 9**. Pela análise dos mesmos, verifica-se que na *Okara* 37,0% do peso seco são componentes proteicos, 13,0 % de lípidos, 2,8 % de cinzas, sendo que 4,7 % da composição total está directamente relacionada com os hidratos de carbono e 42,5% com a fibra alimentar.

Tabela 9 - Composição média dos grãos de soja, do extrato aquoso e do *Okara* em base seca (g/100g) (**Bowles and Demiate 2006**)

	Cinzas (DP)	Proteínas (DP)	Lípidos (DP)	Hidratos de carbono totais	
				Carb. Sol.	Fibras alim.
Soja	4,7 – 0,064	37,3 – 0,078	21,2 – 0,678	28,8	8,0
Extrato aquoso	2,4 – 0,009	33,0 – 0,026	17,7 – 0,071	46,9*	Vestígios
Okara	2,8 – 0,003	37,0 – 0,019	13,0 – 0,049	4,7*	42,5

*Determinado por diferença

No **Anexo 1** é possível consultar mais informação acerca da *Okara*.

4. Derivados de soja

Hoje em dia existem vários tipos de derivados de soja, alguns são produzidos através da utilização de técnicas modernas e produzidos em grande escala, enquanto outros são produzidos de forma mais moderada recorrendo a técnicas orientais de processamento. Estes produtos são divididos em duas categorias: fermentados e não fermentados (**Golbitz 1995**).

4.1. Extracto hidrossolúvel de soja ou “Leite de soja”

O “leite” de soja foi inventado na China por An Liu há 2000 anos (**He and Chen 2013**). O “leite” de soja não é mais do que o extracto hidrossolúvel de soja, resultante do processo de extracção a partir dos grãos de soja. A bebida de soja tal qual como o consumidor ocidental a conhece resulta da combinação do extracto hidrossolúvel de soja e ingredientes adicionados de forma a obter-se um produto final estabilizado e sensorialmente agradável. O extracto hidrossolúvel de soja é usado como base numa ampla variedade de produtos, incluindo tofu, “iogurte de soja”, queijos à base de soja (**Golbitz 1995**).

Muito embora o “leite” de soja apresente teores de proteína e gordura similares ao leite de vaca, e não possua nem colesterol nem lactose (**He and Chen 2013**), o consumidor

ainda associa os produtos de soja a um sabor desagradável característico a grão crú (*beany*) o que tem limitado o consumo destes produtos. Assim sendo, foi de particular importância a identificação e inactivação dos principais componentes responsáveis pelo sabor indesejável a *beany* no “leite” de soja.

A inactivação da lipoxigenase pode, aquando da etapa de moagem em meio alcalino (solução de bicarbonato de sódio) e com temperatura, reduzir os sabores desagradáveis. No entanto, só com o recurso a tecnologia moderna, já aplicada na indústria de lacticínios, e utilizando um processo de desodorização do extracto hidrossolúvel de soja, foi possível o desenvolvimento de “Leite” de soja e derivados conforme se conhece hoje em dia (**Golbitz 1995**). As etapas para obtenção do extracto hidrossolúvel de soja, através de um dos métodos mais comuns actualmente, encontram-se descritas de forma resumida na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Cuidados a verificar nas diferentes etapas do processo de produção do extracto hidrossolúvel de soja

Etapa do processo	Condições	Efeitos	Cuidados
Armazenamento e limpeza do grão de soja	Temperaturas elevadas e humidade	Solubilidade da proteína irá diminuir	Controlo à recepção do grão, escolha de grãos partidos e com cores incaracterísticas. Controlo das condições de armazenamento
	Quebra da estrutura do grão	Lipoxigenase irá reagir com os ácidos gordos polinsaturados e formar-se-ão compostos responsáveis pelo sabor a <i>beany</i>	
Moagem	A moagem destrói por completo a estrutura celular	Lipoxigenase entra em contacto com os ácidos gordos polinsaturados	Controlo de tempos e temperatura, de forma a desactivar correctamente a lipoxigenase
	Temperatura acima de 80°C durante 30 s	Inactivação da lipoxigenase	
Centrifugação	Proteínas insolubilizadas durante o armazenamento e pré-tratamento	Não são facilmente extraídas, pelo serão descartadas juntamente com as fibras na Okara	Controlo das condições de armazenamento e pré-tratamento. Controlo das temperaturas de processo
	Pasta de soja a alta temperatura	Algumas proteínas irão agregar-se à fibra na Okara	
Desactivação	Tratamento térmico (120°C)	Destruição dos Inibidores da tripsina	Controlo das condições de processo, nomeadamente temperatura e pH
		Formação de agregados de proteína, o que representa um risco de precipitação e sedimentação	
		Reacção entre proteínas e hidratos de carbono (reacções de Maillard) o que poderá resultar em escurecimento do produto	

	pH elevado	Formação de agregados proteicos	
UHT e homogeneização	Tratamento térmico (UHT)	Produto comercialmente estéril Formar-se-ão alguns agregados proteicos que poderão ser quebrados pela homogeneização prevenindo assim a sedimentação	Controlo dos parâmetros do processo, nomeadamente, tempo, temperatura e pressão.

4.2. “Iogurte” de soja

O iogurte de soja ou *soghurt*, é produzido pela fermentação do extracto hidrossolúvel de soja, por meio de bactérias produtoras de ácido láctico. O produto obtido contém cerca de 12%-14% de sólidos totais e apresenta uma textura suave, macia e frágil, com um sabor característico a fermentado (**Imram et al. 2003**). Tal como os iogurtes de leite, os iogurtes de soja podem ser classificados como sólidos, batidos ou líquidos.

Na produção de “iogurtes” de soja sólidos, o extrato clarificado de soja é inoculado, embalado, incubado e arrefecido nas embalagens finais. No caso dos iogurtes batidos, o extracto clarificado de soja é inoculado, incubado, arrefecido e batido em tanques apropriados para o efeito, uma das etapas finais é a mistura com preparado de fruta, e o processo termina com o embalamento.

Os iogurtes líquidos de soja apresentam uma baixa viscosidade e são produzidos da mesma forma que os iogurtes batidos (**Imram et al. 2003**).

Na **Figura 8** é possível ver um esquema do processo de produção de iogurtes de soja.

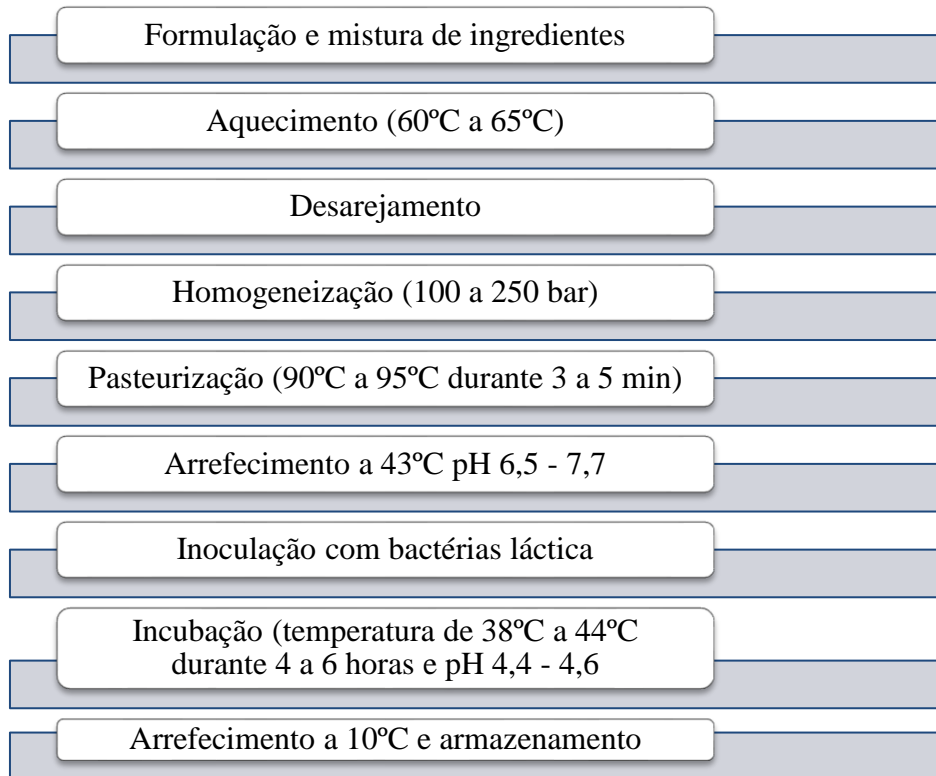


Figura 8 – Processo de produção de iogurte de soja (**Imram et al. 2003**)

A soja é considerada um bom substrato para alimentos funcionais, uma vez que a fermentação por bactérias probióticas tem o potencial de, reduzir os níveis de alguns hidratos e carbono associados à produção de gás nos intestinos (estaquiose e rafinose), aumentar os níveis de isoflavonas livres, e favorecer alterações desejáveis nas populações bacterianas do tracto gastrointestinal (**Jooyandeh 2011**).

4.3. Tofu

Tal como o “leite” de soja o *tofu* tem origem na China, e consiste numa coalhada obtida por coagulação de proteína de soja usando sais de minerais ou ácido.

Historicamente, o *tofu* foi sempre a maior fonte de proteína na dieta chinesa uma vez que a oferta de carne não era abundante, por outro lado, o *tofu* produzido com recurso ao coagulante de cálcio constituiu também uma importante fonte de cálcio, um mineral essencial no qual a dieta típica chinesa é deficiente (**He and Chen 2013**).

O sulfato de cálcio, o cloreto de cálcio, o cloreto de magnésio e a glucono delta-lactona são os agentes coagulantes mais comuns empregues na coagulação do extracto hidrossolúvel de soja (**He and Chen 2013**).

O *tofu* pode ser caracterizado de acordo com o conteúdo em água, e textura, estas diferenças estão relacionadas com a proporção de água e grão de soja, tipo e concentração do coagulante utilizado e quantidade de “soro” removido.

Na **Figura 9** é possível constatar as diferenças estruturais da coalhada que se forma mediante adição de dois agentes coagulantes diferentes (**Boye and Ribéreau 1999**).

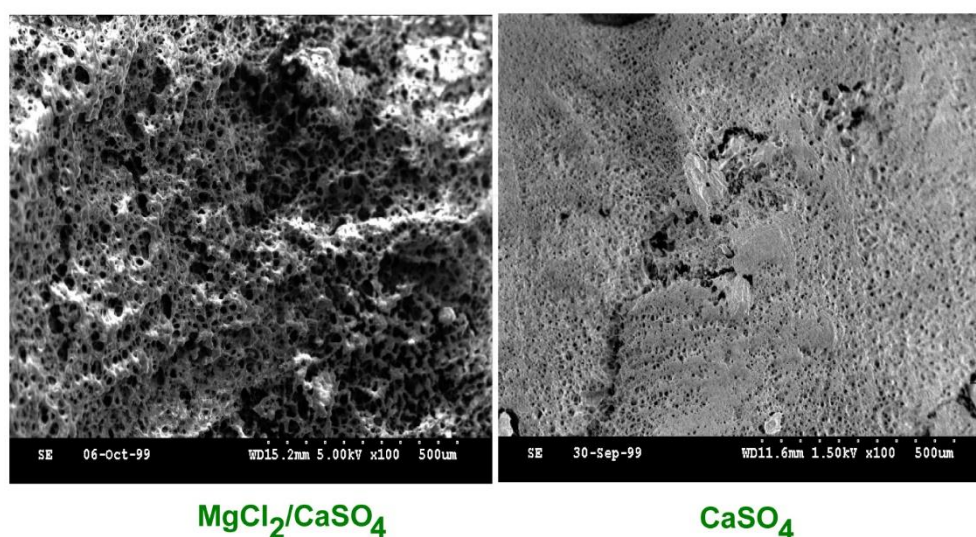


Figura 9 – Microestrutura do *tofu* e correspondente agente coagulante utilizado (**Boye and Ribéreau 1999**)

Para uma mais fácil descrição podemos dividir o *tofu* em suave ou sedoso ou *tofu* prensado (**Imram et al. 2003**). O processo de produção do *tofu* suave inicia-se com o aquecimento do extracto hidrossolúvel de soja entre 65 a 70°C, segue-se a adição de sulfato de cálcio numa concentração baixa, ao fim de 30 a 60 minutos forma-se uma coalhada fina, lisa e firme que é deixada sem quebrar. No caso do *tofu* prensado, o coagulante é adicionado ao extracto hidrossolúvel de soja quente com agitação vigorosa, a coalhada é quebrada e prensada, a pressão exercida determina o grau de firmeza do produto final.

O *tofu* pode ser caracterizado como: *tofu* brando, firme e extra firme, o *tofu* brando contém entre 88% a 90% de humidade, 6% de proteína e 10% a 12% de sólidos e apresenta

uma textura similar ao queijo. O *tofu* firme e extra firme contém menos humidade e uma textura mais firme (**Imram et al. 2003**).

Em base húmida, o *tofu* prensado tem um teor de cerca de 85% de humidade e contém 7,8% de proteína, 4,2% de lípidos, e 2 mg/g de cálcio. Para além das diferenças de composição, devido ao tipo de sais utilizados, os benefícios de saúde podem também variar devido a diferenças na digestibilidade da proteína resultantes da estrutura da rede induzida pelo sal específico utilizado (**Boye and Ribéreau 1999**).

Para além das categorias de *tofu* apresentadas acima existem ainda dois tipos de *tofu* fermentado. Um consiste em cubos de *tofu* desidratado conservado em salmoura, vinho chinês, vinagre e cebolinho, ou conservado unicamente numa pasta de arroz, pasta de feijão e soja, o outro tipo de *tofu* fermentado caracteriza-se por um *tofu* brando onde são utilizadas bactérias fermentativas (não definidas), e cujo método tradicional consiste na preparação de uma marinada feita de leite fermentado, vegetais e carne, podendo ainda adicionar-se camarão seco, amaranto verde, mostarda, rebentos de bambu e ervas chinesas. Este tipo de *tofu* tem um forte odor que é muitas vezes descrito como podre e fecal (**Jooyandeh 2011**).

No **Anexo 2** apresentam-se outros derivados de soja, através dos quais se constata a versatilidade do grão de soja enquanto matéria-prima.

II. OBJETIVOS E PLANEAMENTO

O objectivo deste trabalho foi desenvolver 2 bebidas de soja (bebida de soja com e sem adição de cacau) e 2 iogurtes (sabor natural e com adição de preparados de fruta), sendo expectável que estes produtos venham a ser comercializáveis pela empresa.

As diferentes etapas definidas para o processo de desenvolvimento, após consulta bibliografia foram:

- Formulação;
- Ensaio laboratoriais;
- Ensaio industriais de produção de bebidas de soja e iogurtes;
- Avaliação microbiológica: mesófilos aeróbios totais, bolores e leveduras;
- Contagem de bactérias lácticas: *Streptococcus thermophilus* e dos *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*;
- Avaliação físico-química: pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis totais, proteína, humidade, gordura e viscosidade;
- Avaliações organolépticas;
- Ensaio industrial.

III. MÉTODOS E MATERIAIS

5. Desenvolvimento de novos produtos

A metodologia de desenvolvimento de novos produtos implementada na Nutre – Industrias Alimentares, S.A., encontra-se esquematizada na **Figura 10**.

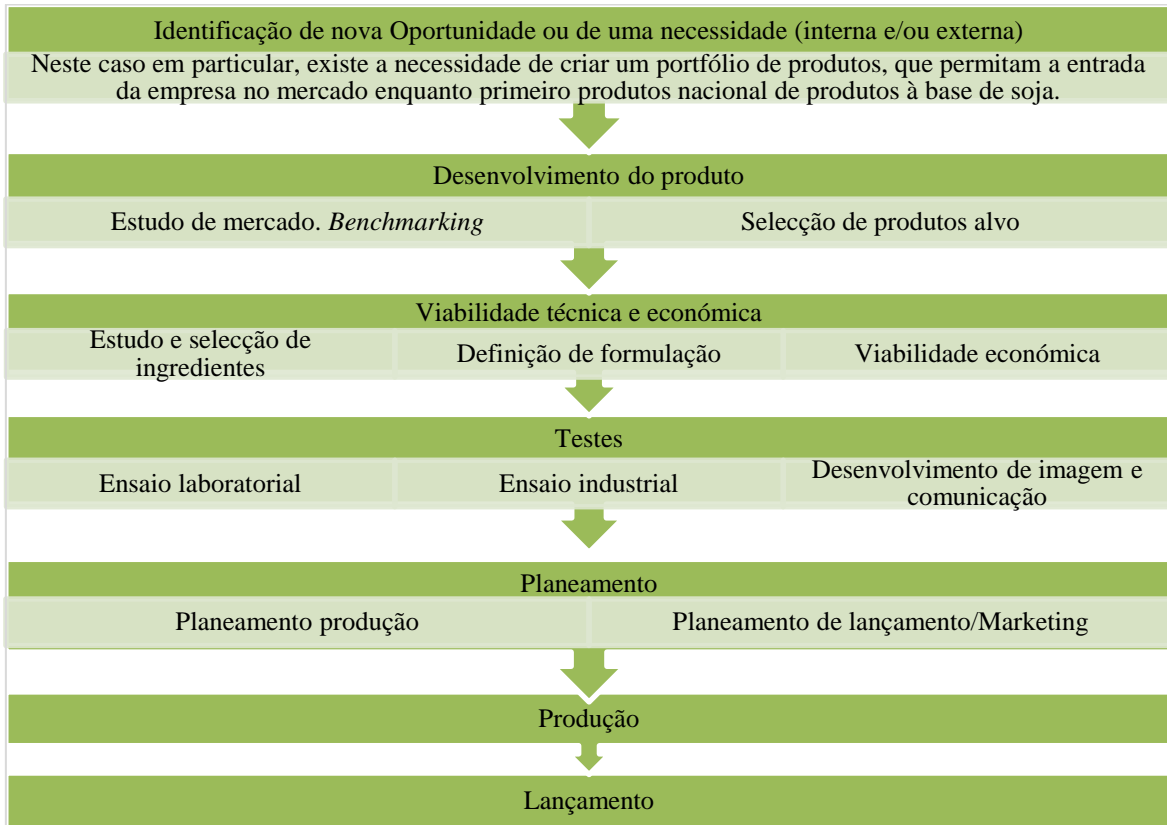


Figura 10 – Esquema do processo de desenvolvimento de novos produtos implementado na Nutre – Industrias Alimentares, S.A.

6. Processo produtivo

A Nutre – Indústrias Alimentares, S.A., tem instalada tecnologia Tetra Pak, para a produção de bebidas de soja ultrapasteurizadas, conforme mostra o esquema representado na **Figura 11**.

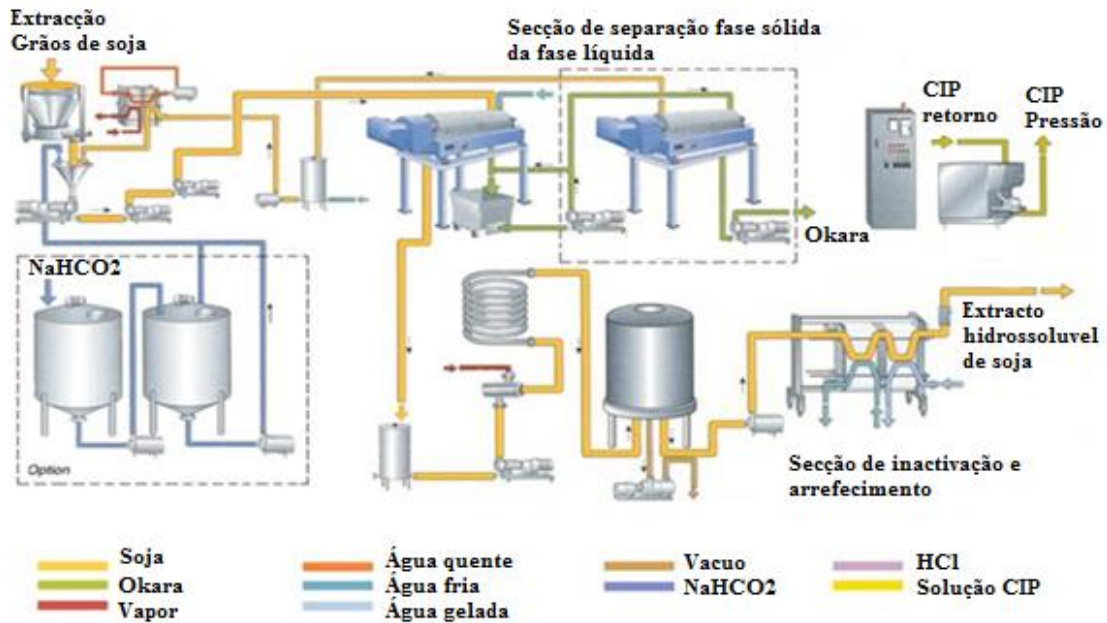


Figura 11 - Esquema do processo produtivo de bebida de soja ultrapasteurizada

A soja é recepcionada em grão e sofre um processo de limpeza (onde são eliminadas pedras e outros objectos estranhos), posteriormente e antes do descasque é encontra-se instalado um selector óptico que elimina os grãos de soja que apresentem cores fora do padrão (por ex: verdes e pretos), seguindo depois o grão para calibração e descasque.

Antes da fase de extracção o grão já limpo segue para a fase de descasque. Aqui, a linha de produção está equipada com moínhos que se ajustam aos diferentes calibres do grão procedendo assim a um descasque mais eficiente do grão. Findas as fases de limpeza e descasque do grão este segue para a fase de extracção e subsequentes, as quais são levadas a cabo nos equipamentos esquematizados na **Figura 11**.

Aquando da instalação da linha de produção foram elaborados os fluxogramas de processo que permitem visualizar todas as etapas do processo desde a entrada das matérias-primas até aos produtos finais. Em simultâneo foi também concebida a Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP), que pode ser consultada no **Anexo 3**.

7. Desenvolvimento de bebida de soja ultrapasteurizada aromatizada e com adição de cacau

Aquando da instalação da unidade fabril, foi necessário desenvolver os vários produtos que iriam fazer parte do portfólio da empresa.

7.1. Formulação

O processo de desenvolvimento iniciou-se com um estudo de mercado com o intuito de perceber, que tipos de produto existiam no mercado, qual o produto/marca líder de mercado, quais os pontos fracos e fortes desse produto, qual a listagem de ingredientes, qual a sua tabela nutricional e *claims* nutricionais. A empresa tem como objectivo desenvolver um produto semelhante em termos nutricionais e sensorialmente superior ao produto líder de mercado. Do processo de *benchmarking* realizado foi possível constatar que os produtos alvo (marca Alpro) apresentam a declaração nutricional e listagem de ingredientes apontados na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Declaração nutricional e listagem de ingredientes dos dois produtos considerados como alvo

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL POR 100 mL		
Produto	Bebida de soja original ALPRO	Bebida de soja com cacau ALPRO
Energia	170 kJ / 40 kcal	255kJ / 61kcal
Lípidos	1,8g	1,8g
dos quais:		
saturados	0,3g	0,4g
monosaturados	---	0,4g
polinsaturados	---	1,0g
Hidratos de carbono	2,8g	7,8g
dos quais:		
açúcares	2,8g	7,5g
Fibra	0,0g	0,0g
Proteínas	3,0g	3,1g
Sal	0,08g	0,14g
Vitamina D	0.75µg 15%*	0.75µg 15%*
Vitamina B2	0.21mg 15%*	0.21mg 15%*
Vitamina B12	0.38µg 15%*	0.38µg 15%*
Cálcio	160mg 20%*	160mg 20%*

* = dos valores de referência do nutriente

Produto	Bebida de soja Original	Bebida de soja com cacau
Listagem de ingredientes	Água, grãos de soja descascados (5,9%), açúcar, fosfato tricálcico, regulador de acidez (fosfato monopotássico), sal marinho, aroma, estabilizador (goma gelana), vitaminas (riboflavina (B2), B12, D2).	Água, açúcar, grãos de soja descascados (5,8%), cacau magro (1,5%), carbonato de cálcio, estabilizadores (carragenina, goma de guar, goma xantana), aroma, sal marinho, regulador de acidez (fosfato dipotássico), vitaminas (riboflavina (B2), B12, D2), aroma natural.

Após análise da informação obtida e de todas as fichas técnicas dos ingredientes, foi feita uma estimativa nutricional com o objectivo de definir uma formulação que permita a obtenção de uma declaração nutricional aproximada à do produto alvo. Seguidamente, foi feito um ensaio em laboratório com duas formulações definidas e que se distinguem entre si apenas em termos sensoriais. As duas formulações e o produto alvo foram avaliadas físico-química e sensorialmente, no sentido de avaliar qual a percepção que os consumidores tinham dos produtos em desenvolvimento face ao produto alvo.

Como os resultados obtidos a nível físico-químico e sensorial foram bastante satisfatórios decidiu-se avançar para a produção de um ensaio piloto de forma a ser possível avaliar efectivamente o comportamento da formulação, pois no laboratório não existem equipamentos capazes de replicar as condições de temperatura (acima de 100°C) e homogeneização definidas para o processo produtivo.

Para além das formulações, foi necessário definir os procedimentos e parâmetros físico-químicos a analisar em todos os lotes produzidos na linha de produção. Os parâmetros e procedimentos definidos para controlo de qualidade dos produtos encontram-se descritos nas secções que se seguem.

7.2. Parâmetros físico-químicos

7.2.1. Determinação de pH e Sólidos solúveis totais (°Bx)

O pH foi medido diretamente em alíquotas das amostras, de acordo com a norma NP EN 1132:1996, utilizando um potenciómetro de referência InLab da marca Mettler Toledo.

Para determinação do teor de sólidos solúveis foi utilizado um refractómetro automático modelo BX-5000α da marca Atago. As análises foram realizadas em triplicado.

7.2.2. Proteína

A quantificação do teor de proteína foi feito por determinação do nitrogénio total e proteína bruta pelo processo de digestão Kjeldahl conforme metodologia descrita na norma internacional ISO 20483:2013, e consoante as notas de aplicação do fabricante do equipamento, recorrendo para isso aos equipamentos instalados no laboratório da empresa: Tecator™ Digestor 8, Tecator™ Scrubber e Kjeltac 8200, da marca FOSS.

O método utilizado, baseia-se na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 420°C com ácido sulfúrico concentrado durante 1 hora, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica. O azoto presente na solução ácida resultante é determinado por destilação, seguida de titulação com ácido clorídrico, de acordo com o procedimento descrito na **Tabela 27** no **Anexo 4**.

7.2.2.1. Controlo do Teor de Proteína no extracto hidrossolúvel de soja

O extracto hidrossolúvel de soja é o ingrediente principal das bebidas de soja, e o teor de proteína das diferentes formulações está directamente relacionado com a quantidade de extracto hidrossolúvel de soja (também designado de base de soja) a incorporar, assim, a proteína é o parâmetro mais importante em todo o processo produtivo, desde a seleção da espécie de grão, compra do grão de soja e consequentemente para o rendimento do processo.

O processo de extração da proteína de soja é a primeira etapa do processo produtivo imediatamente após a fase de tratamento do grão, e é esta a fase fundamental

em termos de rendimento do processo. Sendo a proteína o parâmetro mais relevante é necessário controlá-lo em linha para o caso de ser necessário afinar parâmetros nos equipamentos, para isso, e uma vez que quantificar o teor de proteína por métodos químicos é bastante demorado, foi necessário estudar/definir um procedimento mais expedito para efectuar este controlo.

O procedimento a validar/definir parte do pressuposto que o macronutriente mais abundante no grão de soja é a proteína, pelo que o teor de sólidos solúveis estará correlacionado com a proteína extraída no processo.

Para validação do procedimento procedeu-se da seguinte forma: aquando do comissionamento da linha de produção, efectuaram-se várias medições dos sólidos solúveis totais em diferentes lotes de extracto hidrossolúvel de soja produzidos. As amostras recolhidas de cada um dos lotes foram submetidas à medição de sólidos solúveis totais por refractometria utilizando-se um refractómetro portátil automático modelo BX-5000 α da marca Atago, os valores obtidos são expressos em °Brix, as mesmas amostras são posteriormente encaminhadas ao laboratório interno para quantificação do teor de proteína por determinação do nitrogénio total e proteína bruta pelo processo de digestão Kjeldahl conforme metodologia descrita na norma internacional ISO 20483:2013, e consoante as notas de aplicação do fabricante do equipamento.

Posteriormente traçou-se um gráfico com os resultados obtidos quer dos sólidos solúveis totais medidos na linha de produção quer dos respectivos teores de proteína de forma a obter conclusões.

7.2.3. Lípidos

A extracção e quantificação do teor de gordura nas bebidas de soja é feita pelo método de Soxhlet, segundo a norma ISO 659:2009 e notas de aplicação do fabricante FOSS, consoante o procedimento descrito na **Tabela 28** que se encontra no **Anexo 4**. A formulação em estudo foi submetida a ensaios internos para quantificação de gordura.

7.2.4. Determinação do teor de humidade e teor de sólidos

A quantificação do teor de humidade foi efectuada segundo a norma NP 784:1970, conforme procedimento descrito na **Tabela 29** que se encontra no **Anexo 4**.

7.2.5. Viscosidade aparente

Considera-se relevante a avaliação deste parâmetro de forma a perceber se a formulação testada e o produto alvo apresentam consistências e comportamento reológico semelhantes.

O viscosímetro existente no laboratório da empresa e utilizado para as medições é da marca Brookfield modelo LVDV-II+P. Para as bebidas de soja acoplou-se ao viscosímetro o *spindle* 62 e efectuaram-se 4 medições à velocidade angular de 20 rotações por minuto (rpm), 30 rpm, 50 rpm e 60 rpm.

7.3. Análise sensorial

A aceitação de um produto por parte do consumidor está directamente relacionada com as propriedades sensoriais dos alimentos em conjunto com os parâmetros químicos e microbiológicos do mesmo (Murray 2001). A análise sensorial é usada para medir, analisar e interpretar a percepção que o consumidor tem de um determinado produto, ou seja, de que forma o produto é percebido ao nível dos cinco sentidos: visão, olfacto, paladar, tacto e audição (Lawless 2010).

Os métodos utilizados em análise sensorial podem ser classificados (Lawless 2010) em:

- Teste descritivo: método analítico, utilizado para descrever e quantificar diferenças e semelhanças entre as amostras;
- Testes discriminativos: método analítico, utilizado para medir diferenças entre um conjunto de amostras;
- Testes afectivos ou de preferência: método hedónico, utilizado para determinar preferências e os dados hedónicos, bem como, as expectativas do produto.

A primeira análise sensorial foi realizada internamente recorrendo a um teste de preferência, com recurso a uma escala hedónica de 5 pontos (Figura 25, Anexo 6). O painel de provadores era constituído por 15 colaboradores da empresa, não treinados e não consumidores de produtos de soja.

Posteriormente considerou-se relevante realizar uma análise sensorial em laboratório externo em conformidade com o disposto na norma ISO 4121: 2003, com painel alargado e em sala de prova adequada conforme norma NP 4258:1993. Nesta análise,

utilizou-se o produto líder de mercado Alpro e a formulação em estudo para comparação.

7.4. Definição do tempo de vida útil

7.4.1. Ensaio microbiológicos

7.4.1.1. Preparação de amostras e diluições

As bebidas produzidas em linha foram todas submetidas a ensaios microbiológicos. Os microrganismos pesquisados foram: mesófilos aeróbios totais pelo método de incorporação em placa, e os bolores e leveduras foram analisados recorrendo ao método por espalhamento.

7.4.1.2. Mesófilos totais aeróbicos

Os microrganismos mesófilos aeróbicos totais (TAM) foram quantificados pelo método descrito nas normas ISO 4833:2003, conforme procedimento descrito na **Tabela 30** que se encontra no **Anexo 4**.

7.4.2. Ensaio de estabilidade

Uma vez que estamos a falar de produtos ultrapasteurizados o tempo de vida útil, está também relacionado com a estabilidade do produto. Como não é prático aguardar o tempo real que se espera obter como data de validade (9 meses), decidi fazer-se um ensaio comparativo, de forma a avaliar se os produtos em desenvolvimento apresentam um comportamento em termos de estabilidade semelhante ao produto alvo (bebida Alpro Original). Pela análise da embalagem foi possível constatar que o produto alvo tem uma validade de 12 meses.

Realizou-se um ensaio de estabilidade, recorrendo a um analisador de dispersões (**Figura 12**) da marca LUMISIZER apoiado pelo *software* SEPView®.



Figura 12 - Analisador de dispersões da marca LUMISIZER

O analisador de dispersões permite analisar as interações partícula – partícula, a compressibilidade de partículas, flocos, géis e o comportamento elástico de sedimentos.

A evolução dos perfis de transmissão contém as informações completas sobre a cinética de quaisquer alterações que ocorram na concentração das partículas da amostra, devido a sedimentação, floculação, coalescência ou separação de fases.

7.4.2.1. Bebida de soja original

A amostra de bebida de soja aromatizada SN e as amostras dos produtos alvo, Alpro Natural e SoyNatural da ViveSoy, foram submetidas aos seguintes ensaios:

1º Ensaio – 2300g durante aproximadamente 2 horas à temperatura de 25°C com intervalos entre aquisição de perfis de transmissão com a duração de 30 segundos.

2º Ensaio – 575g durante aproximadamente 8 horas à temperatura de 25°C com intervalos entre aquisição de perfis de 115 segundos.

Em que: **g** - aceleração da gravidade normal

7.4.2.2. Bebida de soja com cacau

Foram analisadas duas formulações com estabilizantes distintos SC02 e SC03 e comparados com as bebidas da marca Vivesoy e Alpro.

SC02 – Formulação Nutre (estabilizadores: goma xantana e goma guar);

SC03 – Formulação Nutre (estabilizador: goma gelana);

Alpro Choco (estabilizadores: goma xantana e goma guar);

Vive Soy (estabilizador: carragenato e celulose)

As amostras foram submetidas ao seguinte ensaio:

1º Ensaio – 2300g durante aproximadamente 2 horas à temperatura de 25°C com intervalos entre aquisição de perfis de transmissão com a duração de 30 segundos.

Em que: **g** - aceleração da gravidade normal

7.4.3. Estudo de vida útil em tempo real

Para além da realização do estudo de estabilidade descrito no ponto 7.4.2, iniciou-se também um estudo no laboratório externo Silliker, centrado-se, na avaliação de pH ao longo do tempo e num estudo sensorial com o intuito de avaliar a evolução das características organolépticas do produto e no qual foram variadas condições de envelhecimento (Temperatura e Humidade relativa (HR) ambiente: 30°C e 65%HR e 40°C e 75% HR) e determinações de pH das amostras.

As análises sensoriais foram levadas a cabo pelos provadores do painel Silliker. De cada um dos produtos foram conservadas amostras a aproximadamente 0°C que serão utilizadas como padrão de referência sensorial ao longo do estudo. Para cada produto e cada condição climática, realizou-se uma análise sensorial, comparando-o com o produto padrão tido como referência, para observar a sua evolução.

O resultado destes controlos apresenta-se, para cada um dos parâmetros organolépticos, de duas formas diferentes: uma através de pontuação, na qual se compara o produto avaliado com o padrão de referência, a outra, através de comentários que complementam a dita pontuação.

Para estabelecer essa pontuação, cada um dos produtos avaliados é comparado com o seu padrão de referência e pontua-se de acordo com a seguinte escala:

7. Igual ao padrão
6. Aceitável, mas ligeiramente inferior ao padrão
5. Aceitável, mas medianamente inferior ao padrão
4. Entre aceitável e inaceitável
3. Ligeiramente inaceitável
2. Medianamente inaceitável
1. Totalmente inaceitável

No caso em que, para qualquer dos parâmetros organolépticos avaliados, um produto obtenha uma pontuação inferior ou igual a 4, o estudo pára, já que o produto chegou a um nível de deterioração que o faz excessivamente diferente do padrão.

8. Desenvolvimento de “iogurte” de soja

A utilização do termo Iogurte obedece a determinados requisitos legais. Em Portugal de acordo com a alínea a) do número 1 da Portaria nº 742/1992 de 24 de Julho, “iogurte é o produto coagulado, obtido por fermentação láctica devido à acção exclusiva do *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e do *Streptococcus thermophilus* sobre o leite e produtos lácteos (leite pasteurizado, leite pasteurizado parcialmente desnatado, leite pasteurizado desnatado ou nata pasteurizada) com ou sem a adição de leite em pó ou derivados, açúcares e edulcorantes, devendo a flora específica estar viva e abundante no produto final (igual ao superior a 5×10^7) (Ministério 1992).

Por conseguinte o termo mais correcto para designação do produto desenvolvido seria, sobremesa fermentada à base de soja. Muito embora o iogurte e a sobremesa fermentada de soja sejam produtos distintos, o processo de fabrico aplicado para o desenvolvimento e produção da sobremesa fermentada de soja será o mesmo, conforme descrição no capítulo 4.2. e no fluxograma de fabrico.

À semelhança do que acontece com a produção de iogurtes, serão utilizadas bactérias lácticas para produção da sobremesa fermentada de soja. As bactérias lácticas são muito utilizadas pela indústria pela sua capacidade fermentativa, produzindo ácido láctico, e outros metabolitos, e consequentemente acidificação por fermentação de açúcares.

As bactérias lácticas actuam mediante dois tipos de mecanismos de fermentação, nomeadamente: homofermentação (com produção principalmente de ácido láctico) e heterofermentação (produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono). O seu metabolismo permite a diminuição do pH do meio, inibindo o crescimento de microrganismos potencialmente patogénicos. São muitas vezes utilizadas como probióticos graças à sua capacidade de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, aderindo às células do epitélio intestinal levando à prevenção do crescimento e proliferação de bactérias patogénicas.

As propriedades físicas mais importantes do iogurte, que definem a qualidade, são a consistência e viscosidade. No caso das sobremesas fermentadas de soja, as análises químicas de rotina que se realizam são, o teor de gordura, proteína, acidez titulável e pH. Aquando da definição da formulação é importante também o resíduo seco. Tendo em consideração a intensidade da acidez, o produto pode ser classificado em suave ou insípido, e ácido ou muito ácido.

8.1. Formulação

Em termos de processo produtivo a empresa fornecedora de equipamentos Tetra Pak em conjunto com a Nutre e na sequência dos ensaios laboratoriais efectuados, propôs a instalação de um processo de fabrico praticamente igual ao processo de fabrico dos iogurtes de leite.

A diferença óbvia entre os dois processos prende-se com o tipo de matéria-prima e processo de obtenção da mesma. No caso dos “iogurtes” de soja, a matéria-prima principal é o extracto hidrossolúvel de soja. Em termos processuais a obtenção do mesmo é comum às bebidas de soja, por conseguinte, até à etapa de fermentação o preparado a fermentar sofre as mesmas etapas de produção que uma bebida de soja.

O processo de desenvolvimento das sobremesas fermentadas de soja, iniciou-se com um estudo *benchmarking*, isto é, dos produtos que existiam no mercado decidiu-se avaliar os produtos de marca de fornecedor (MDF) líder de mercado, ou seja, as marcas Alpro, Sojasun e Joya e também perceber a qualidade da oferta das marcas de distribuidor, tais como, Área Viva (Continente), Pura vida (Pingo doce) e Auchan (Jumbo) pois, um dos enfoques comerciais da empresa é produzir marcas próprias das cadeias de distribuição (MDD).

Tendo como ponto de partida a análise destas formulações foram feitos vários ensaios laboratoriais onde variamos alguns ingredientes com papel fundamental ao nível da consistência e estabilidade do produto, por exemplo, amido e pectina. À semelhança do que aconteceu com as bebidas de soja, inicialmente foi feito um levantamento de mercado de modo a perceber quais os produtos que existiam e respectivas marcas associadas, posteriormente fizeram-se alguns ensaios sensoriais com os produtos existentes de forma a perceber quais os que melhor traduziam a filosofia da Nutre, isto é, produto o mais aproximado possível em termos nutricionais e sensoriais aos iogurtes de leite. O sabor a “*beany*” é indesejável e por conseguinte a formulação e processo produtivo a adoptar devem ter em consideração tal facto.

Com o objetivo de obtermos um produto com características nutricionais aproximadas ao iogurte de leite, as formulações e procedimentos testados laboratorialmente encontram-se na **Tabela 32** no **Anexo 5**.

8.2. Análises físico-químicas

Algumas das análises físico-químicas realizadas às formulações testadas são as mesmas que efetuamos às bebidas de soja, ou seja, quantificação de proteína, gordura e teor de sólidos. Para além destas análises, foram feitas as análises abaixo listadas.

8.2.1. Acidez titulável

A análise de acidez foi feita segundo a norma NP 12147: 1999 por volumetria de neutralização com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 N e solução alcoólica de fenolftaleína a 1% como indicador, conforme procedimento descrito na **Tabela 31** que se encontra no **Anexo 4**.

8.2.2. pH e Sólidos solúveis totais (°Brix)

O pH foi medido diretamente em alíquotas das amostras, de acordo com a norma NP 1132:1996, utilizando um potenciómetro (InLab da Mettler Toledo).

Para determinação do teor de sólidos solúveis foi utilizado um refractómetro automático modelo BX-5000 α da marca Atago. As análises foram realizadas em triplicado.

8.2.3. Viscosidade aparente

Nas sobremesas fermentadas de soja, foi medida a viscosidade aparente da formulação em estudo em dois momentos distintos: durante o processo de fermentação e durante o armazenamento durante 45 dias à temperatura de refrigeração 0-5°C. Utilizou-se para isso o mesmo equipamento utilizado para as medições na bebida de soja, mas acoplou-se o *spindle* 63, e efectuaram-se 3 medições por amostra à velocidade angular de 4 rpm.

8.3. Controlo microbiológico durante o armazenamento

8.3.1. Mesófilos aeróbios totais ou Microrganismos a 30°C

Para a preparação da suspensão-mãe pesou-se 10 g de sobremesa fermentada de soja a analisar para um frasco com 90 mL de solução de Ringer e procedeu-se à homogeneização da mistura num agitador tipo vortex.

Efectuaram-se diluições decimais até 10^{-4} , começando por retirar 1 mL da suspensão-mãe para um tubo de ensaio contendo 9 mL do diluente. Colocou-se 1 mL de suspensão-mãe e das diluições em placas de petri e através da técnica de incorporação juntou-se 15 mL de PCA (Plate Count Agar, Merck, Alemanha), meio próprio para contagem de microrganismos totais, não selectivo e nutritivo.

Foram analisadas 3 réplicas de amostra e estas foram analisadas em triplicado para cada diluição. As placas foram incubadas em estufa (Binder, Alemanha) a uma temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 ± 3 horas em posição invertida.

8.3.2. Contagem de bolores e leveduras

A suspensão-mãe e diluições foram realizadas da mesma forma que em 8.4.1, apenas diferindo o meio e a técnica utilizada. Alíquotas de 0,2mL de amostra foram semeadas por técnica de espalhamento em meio Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA) previamente gelificado. Este é um meio seletivo para contagem de bolores e leveduras.

Foi também realizada em 3 réplicas de amostra e estas em quintuplicado. Incubaram-se as placas em estufa (Binder, Alemanha) a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias de acordo com a norma ISO 21527-1: 2008.

8.3.3. Contagem de bactérias lácticas totais

O fermento utilizado para produção de amostras de sobremesa fermentada de soja designa-se por Thermophilic YoFlex® culture e foi fornecido pela CHR-Hansen.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: pesaram-se 10 g de amostra de “iogurte” de soja, adicionou-se 90 mL de solução de Ringer e homogeneizou-se com recurso a um Stomacher. Desta solução pipetou-se 1mL para um tubo estéril com 9 mL de solução de Ringer. Cada uma das três réplicas de amostra foi preparada em duplicado. Seguidamente, foram efectuadas diluições decimais em solução de Ringer

estéril e 1 mL de cada uma das diluições foram inoculadas em placa, também em triplicado.

Para analisar as duas culturas *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, foi utilizada a técnica de plaqueamento ou técnica “pour plate”, mas foram utilizados diferentes meios selectivos e as condições de incubação foram usadas de acordo com o microrganismo em questão. Após o tempo de incubação, as placas contendo 15-300 colónias foram contadas, e as contagens foram expressas como log 10 UFC/g de sobremesa fermentada de soja (Kempka et al. 2008).

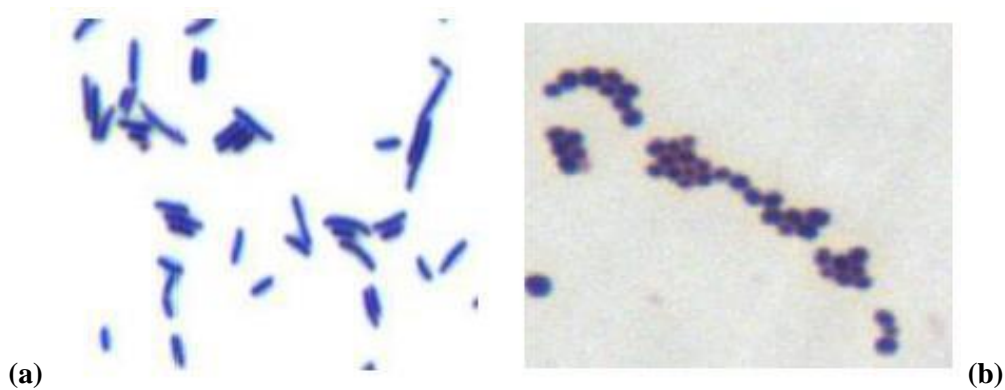


Figura 13 – Imagens microscópicas do *Lactobacillus bulgaricus* (a) e *Streptococcus thermophilus* (b) (Bashiti 2010)

8.3.3.1. Contagem de *Lactobacillus bulgaricus*

O género *Lactobacillus* é um dos géneros mais utilizado em aplicações probióticas, as estirpes mais usadas possuem um pH óptimo de crescimento na ordem dos 4,5 e 6,4, não crescendo a pH inferior a 3,6. A temperatura óptima situa-se entre os 35 e os 40 °C, havendo a possibilidade de crescimento a temperaturas superiores a 45 °C (Rivera-Espinoza 2010). As suas células são, normalmente, da forma de bastonetes longos e finos, formando cadeias. São bactérias Gram-positivas, não formam esporos, são aerotolerantes, carecendo de citocromos e porfirinas e são catalase e oxidase negativas.

A contagem de *L. bulgaricus* na sobremesa de soja foi determinada em placas de ágar de dupla camada da MRS (*Lactobacillus* Agar ACC de Man, Rogosa e Sharpe -. Merck, Alemanha) do meio, pH $5,7 \pm 0,2$, que foi previamente esterilizado a 121 °C

durante 15 minutos. As culturas foram em seguida enumerados após incubação a 30 ° C durante 5 dias. (Merck)

8.3.3.2. Contagem de *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus é uma das bactérias lácticas mais amplamente utilizadas em fermentações pela indústria de laticínios. Esta bactéria é tradicionalmente usada em combinação com *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* para o fabrico de iogurte . Quando ambas as bactérias beneficiam mutuamente da sua associação, ocorre um fenómeno designado por proto-cooperação, que muitas vezes resulta em maiores taxas de acidificação, um pH final inferior, uma população mais abundante *S. thermophilus*, estimulação da produção de compostos aromáticos, uma melhor estabilidade do produto final, e um aumento da produção de exopolissacarídeos quando em comparação com as respectivas monoculturas. Este efeito de cooperação melhora o rendimento da fermentação e é, portanto, de interesse industrial (Herve-Jimenez et al. 2009).

A contagem de *S. thermophilus* na sobremesa de soja foi realizada com recurso ao meio M17 (Liofilchem, Itália), pH = 7,2 ± 0,2, esterilizou-se a 121°C durante 15 minutos. As inoculações foram incubadas a 37°C durante 72 h (Jankowska 2012).

8.4. Análise sensorial

Durante o processo de desenvolvimento da sobremesa fermentada de soja foram realizadas análises sensoriais em dois momentos distintos. A primeira análise, tinha como objectivo seleccionar o produto a considerar como alvo. Após selecção da formulação e realização de um ensaio laboratorial, foi feita uma análise sensorial ao produto resultante e ao produto alvo e voltaram-se a repetir ao 16º dia e ao 32º de armazenamento.

As amostras foram armazenadas à temperatura de refrigeração 0-5°C, e as análises sensoriais foram realizadas por 15 colaboradores da empresa, com recurso a uma escala hedónica de 5 pontos. Os parâmetros qualitativos avaliados foram cor, textura, cremosidade, sabor, doçura, acidez, aroma e aceitabilidade.

IV. RESULTADOS

9. Resultados

9.1. Extracto hidrossolúvel de soja

Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos analisados no extracto hidrossolúvel de soja

Parâmetros físico-químicos analisados na base de soja (extracto hidrossolúvel de soja)

Amostra	Proteína	Média	Desvio padrão	Sólidos solúveis (°Bx)	Média	Desvio padrão	PH (20°C)	Média	Desvio padrão	Humidade (%)	Média	Desvio padrão	Sólidos	Média	Desvio padrão	Viscosidade (cP)			Densidade (g/cm ³)	Média	Desvio padrão
																20 rpm	50 rpm	60 rpm			
Base 1	6,31	6,32	0,0115	14,78	14,82	0,0451	6,9	6,90	0,0058	88,57%	87,03%	0,0135	11,43%	12,97%	0,0135	11,30	10,80	9,71	1,03	1,033	0,0058
	6,33			14,87			6,9			86,05%			13,95%			11,00	10,40	9,00	1,03		
	6,33			14,82			6,89			86,48%			13,52%			11,50	10,78	9,81	1,04		
Base 2	6,34	6,34	0,0100	14,81	14,85	0,0379	6,91	6,90	0,0058	86,02%	86,06%	0,0004	13,98%	13,94%	0,0004	10,50	9,91	9,71	1,03	1,030	0,0000
	6,35			14,88			6,9			86,09%			13,91%			10,10	9,88	9,60	1,03		
	6,33			14,87			6,9			86,07%			13,93%			10,30	9,70	9,40	1,03		
Base 3	6,32	6,33	0,0153	14,81	14,83	0,0252	6,89	6,89	0,0100	87,01%	86,94%	0,0006	12,99%	13,06%	0,0006	11,20	10,60	9,67	1,04	1,033	0,0058
	6,35			14,86			6,88			86,89%			13,11%			11,33	10,45	9,51	1,03		
	6,33			14,83			6,9			86,91%			13,09%			11,26	10,58	9,43	1,03		
Base 4	6,33	6,32	0,0100	14,81	14,81	0,0351	6,89	6,89	0,0058	86,39%	86,27%	0,0011	13,61%	13,73%	0,0011	11,23	10,77	9,61	1,02	1,027	0,0058
	6,31			14,78			6,89			86,24%			13,76%			11,00	10,41	9,10	1,03		
	6,32			14,85			6,9			86,18%			13,82%			11,42	10,68	9,71	1,03		
Base 5	6,32	6,31	0,0058	14,77	14,79	0,0153	6,92	6,91	0,0058	86,33%	86,33%	0,0008	13,67%	13,67%	0,0008	10,88	9,81	9,66	1,04	1,037	0,0058
	6,31			14,8			6,91			86,40%			13,60%			10,71	9,68	9,46	1,03		
	6,31			14,79			6,91			86,25%			13,75%			10,63	9,87	9,52	1,04		
Base 6	6,35	6,35	0,0058	14,88	14,87	0,0361	6,9	6,90	0,0153	86,92%	86,90%	0,0004	13,08%	13,10%	0,0004	11,33	10,45	9,51	1,03	1,030	0,0000
	6,34			14,9			6,92			86,85%			13,15%			11,42	10,68	9,71	1,03		
	6,35			14,83			6,89			86,93%			13,07%			11,30	10,80	9,71	1,03		

Sendo o extracto hidrossolúvel de soja o componente principal dos diferentes produtos de soja passíveis de serem produzidos na linha de produção da Nutre – Indústrias Alimentares, S.A., torna-se imperativo estudar este produto, assim, os ensaios de comissionamento da linha permitiram efectuar várias análises e obter resultados bastante relevantes para a compreensão e domínio do processo de fabrico. Na **Tabela 12** é possível consultar todos os resultados obtidos das análises aos diferentes parâmetros estudados na base de soja. Dois dos parâmetros mais relevantes neste estudo foram a proteína e a sua relação com o teor de sólidos solúveis, pois a partir destes resultados pretendia-se validar/definir um procedimento expedito para controlo do rendimento do processo produtivo e também para definir a quantidade do extracto hidrossolúvel de soja a incorporar em cada receita produzida. Com os valores obtidos foi traçado um gráfico de forma a perceber se existe correlação linear entre o valor de sólidos solúveis totais (°Brix) e o valor de proteína, conforme se pode ver no **Gráfico 1**.

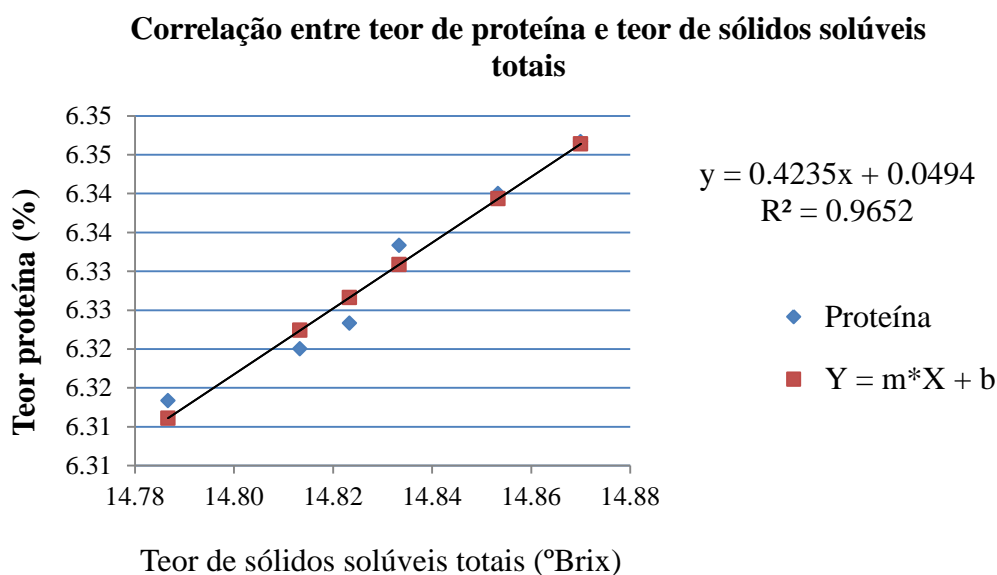


Gráfico 1 – Teor de proteína vs Teor de sólidos solúveis

Confirma-se a existência de correlação entre os parâmetros, e uma vez determinado o coeficiente de correlação, considera-se viável a implementação do procedimento definido, pelo que, todos os lotes passaram a ser produzidos tendo como base o procedimento descrito em 7.2.2.1, e todas as medições são sistematicamente verificadas e validadas aquando dos controlos de qualidade efectuados a cada lote de produto final.

9.2. Bebidas de soja

Tabela 13 – Parâmetros físico-químicos analisados nas formulações de bebida de soja original e na bebida de soja com cacau

Controlo físico-químico efectuado às formulações de bebida de soja original																					
Amostra	Proteína (%)	Média	Desvio padrão	Lípidos (%)	Média	Desvio padrão	Sólidos solúveis (°Bx)	Média	Desvio padrão	pH	Média	Desvio padrão	Humidade (%)	Média	Desvio padrão	Teor em sólidos (%)	Média	Desvio padrão	Densidade ³ (g/cm ³)	Média	Desvio padrão
Formulação 1	3,04	3,03	0,0208	1,88	1,89	0,0115	11,28	11,42	0,1350	6,75	6,76	0,0115	88,77	88,76%	0,0001	11,23%	11,24%	0,0001	1,04	1,033	0,0058
	3,01			1,90			11,42			6,75			88,75			11,25%			1,03		
	3,05			1,90			11,55			6,77			88,76			11,24%			1,03		
Formulação 2	3,01	3,02	0,0058	1,91	1,91	0,0058	11,27	11,35	0,0862	6,83	6,83	0,0058	89,01	89,02%	0,0001	10,99%	10,98%	0,0001	1,04	1,033	0,0058
	3,02			1,91			11,44			6,83			89,03			10,97%			1,03		
	3,02			1,90			11,33			6,82			89,03			10,97%			1,03		
Controlo físico-químico efectuado às formulações de bebida de soja com cacau																					
Amostra	Proteína (%)	Média	Desvio padrão	Lípidos (%)	Média	Desvio padrão	Sólidos solúveis (°Bx)	Média	Desvio padrão	pH	Média	Desvio padrão	Humidade (%)	Média	Desvio padrão	Teor em sólidos (%)	Média	Desvio padrão	Densidade ³ (g/cm ³)	Média	Desvio padrão
SC02	3,15	3,15	0,0058	1,93	1,92	0,0115	15,66	15,56	0,1940	7,4	7,40	0,0058	85,15%	85,29%	0,0016	14,85%	14,71%	0,0016	1,048	1,048	0,0006
	3,16			1,91			15,34			7,4			85,27%			14,73%			1,048		
	3,15			1,91			15,69			7,39			85,46%			14,54%			1,047		
SC03	3,16	3,16	0,0058	1,91	1,90	0,0058	15,87	15,93	0,0600	7,01	7,02	0,0115	84,01%	83,99%	0,0005	15,99%	16,01%	0,0005	1,053	1,053	0,0006
	3,15			1,90			15,99			7,03			83,93%			16,07%			1,053		
	3,16			1,90			15,93			7,01			84,03%			15,97%			1,054		

9.2.1. Proteína

Durante a realização do ensaio laboratorial e no sentido de validar a estimativa nutricional calculada e utilizada para definir quantidades de determinados ingredientes na formulação, foram analisadas 3 amostras por formulação de cada bebida de soja (original/aromatizada e bebida de soja com cacau) para quantificação de proteína tendo-se obtido os resultados apresentados na **Tabela 13**. Conforme se pode verificar os valores de proteína dos produtos desenvolvidos em laboratório estão concordantes com os valores pretendidos 3,0 g/100mL (bebida original), a pequena diferença que se observa pode estar relacionada com o erro do método. Com estes resultados é possível concluir que a quantidade de base de soja definida na formulação teste é a indicada, isto é, confirma-se a relação entre teor de sólidos solúveis (°Brix) medidos em linha, com o teor de proteína no produto final.

Por outro lado, como os valores obtidos nas análises externas (**Figura 14**) efectuadas ao produto em estudo também são concordantes com os resultados obtidos em laboratório interno, podemos considerar que o método interno definido para quantificação de proteína é adequado, contudo, serão efectuadas várias análises quer internas quer externas para a correcta validação do método implementado.

9.2.2. Lípidos

Pela análise dos resultados (**Tabela 13**) podemos verificar que o teor de gordura obtido nas análises efectuadas em laboratório é ligeiramente superior ao valor do produto alvo. Tal facto poderá estar relacionado com a própria matéria-prima utilizada para a produção das bebidas, isto é, a variedade do grão de soja utilizada poderá ter na sua constituição níveis mais elevados de lípidos do que a variedade que foi utilizada pelo fornecedor do produto alvo.

Pela análise nutricional efectuada em laboratório externo à bebida produzida no ensaio piloto podemos constatar que os valores obtidos em termos de lípidos ronda os 1,69g/100g (**Figura 14**) que corrobora os resultados obtidos internamente, pelo que consideramos o método implementado adequado, contudo, serão efectuadas análises quer internas quer externas em vários lotes de produção, que permitirão a monitorização do método implementado.



BOLETIM ANALÍTICO Nº 86486/EG/13

PRODUTO: BEBIDA DE SOJA REFERÊNCIA: ACONDICIONAMENTO: Embalagem de origem DATA DA RECEPÇÃO: 2013/12/18 AMOSTRA: 2013/080417 MARCA: FORNECEDOR: DATA EMB.FABRICO: CAPACIDADE: 200ml DATA DE VALIDADE: 2014/09/06 LOTE: SHY L1134013131555	NUTRE INDUSTRIAS ALIMENTARES, S.A. Zona Industrial de Vagos Lote 104 3840-385 VAGOS Nº CLIENTE: DATA DA COLHEITA: 2013/12/16 às 14:30 LOCAL: SECÇÃO:
---	---

RESULTADOS ANALÍTICOS

DETERMINAÇÃO	MÉTODO	DATA DE INÍCIO	RESULTADO	UNIDADE
Det de humidade	PAFQ 120.2 *	2013/12/20	89,3	g/100g
Det de proteína bruta (F=6.25)	PAFQ 063.0	2013/12/20	3,08	g/100g
Det de matéria gorda	PAFQ 069.0	2013/12/20	1,69	g/100g
Det de cinza total	PAFQ 060.1	2013/12/20	0,91	g/100g
Det de fibra alimentar	PAFQ 230.1	2013/12/20	<0,3(LQ)	g/100g
Det de hidratos de carbono	Dir CE 90/496 *	2013/12/20	5,0	g/100g
Det de valor energético	Dir CE 90/496 *	2013/12/20	47,6	kcal/100g
Det de valor energético, exp kJ/100g	Dir CE 90/496 *	2013/12/20	200,2	Kj/100g
Det de açúcares totais (HPLC)	PAFQ 084.2	2013/12/20	25,5	g/kg
Det de açúcares componentes (HPLC)	PAFQ 084.2	2013/12/20		
frutose			<2,0 (LQ)	g/kg
glucose			<2,0 (LQ)	g/kg
lactose			<2,0 (LQ)	g/kg
maltose			<2,0 (LQ)	g/kg
sacarose			25,5	g/kg
Det de ácidos gordos monoinsaturados	PAFQ 201.0 *	2013/12/20	0,3	g/100 g
Det de ácidos gordos polinsaturados	PAFQ 201.0 *	2013/12/20	1,1	g/100 g
Det de ácidos gordos saturados	PAFQ 201.0 *	2013/12/20	0,2	g/100 g
Det de sódio, AA	PAFQ 008.0	2014/01/09	0,58	g/kg
Det de sal (cálculo)	PAFQ 390.0	2014/01/09	0,14	g/100g
Det de cálcio, AA	PAFQ 008.0	2013/12/20	1,38	g/kg
Det de vitamina A	PAFQ 037.3	2013/12/20	49	µg/100 g
Det de vitamina B12 (CL/DAD)	PNTA 0137 #	2013/12/20	9,0	µg/kg
Det de vitamina D2	EN 12821:09 *	2013/12/20	0,3	µg/100 g
Det de magnésio, AA	PAFQ 008.0	2014/01/09	291	mg/Kg

— Observações/Avaliação da conformidade: —

Colheita não acreditada da responsabilidade do laboratório. (LQ)-limite de quantificação. * - Método não acreditado.
 #-Método acreditado subcontratado a laboratório do grupo Silliker.

NOTA: O boletim analítico refere-se apenas às amostras analisadas, não podendo ser generalizado a partidas ou lotes, salvo nos casos especificamente mencionados.
 Este documento é considerado confidencial, não podendo ser reproduzido a não ser na íntegra, nem utilizado para fins publicitários, sem a nossa prévia autorização escrita.



IQ.09.0

pág 1 de 1

Data de emissão: 2014/01/14

O Director Geral
Fátima Castro

SILLIKER PORTUGAL, S.A.
 Rua Industrial dos Terços, 44
 4410-477 Canelas - V. N. Gaia
 Tel. (+351) 22 715 08 20
 info@silliker.pt

www.silliker.pt
 info@silliker.pt
 www.silliker.pt

Figura 14 – Boletim analítico da bebida de soja produzida no ensaio industrial

9.2.3. Viscosidade

A bebida de soja com cacau quando comparada com a bebida natural apresenta maior viscosidade, facto que pode ser explicado, primeiro pela maior quantidade de sólidos (adição de cacau em pó), e por outro lado, pela utilização de goma guar e goma xantana como estabilizadores da emulsão.

A goma guar produz soluções viscosas com comportamento pseudoplástico quando em baixa concentração, isto é, a viscosidade decresce com o cisalhamento e é usada em aplicações nas quais é necessário espessamento, estabilização, controle reológico e de viscosidade, suspensão, formação de corpo, modificação de textura, consistência e retenção de água. Interage sinergicamente com a goma xantana resultando no aumento da viscosidade da solução (Dziezak 1991). Analisou-se 3 amostras da formulação SC02 e do produto alvo a 4 frequências de rotação distintas, os resultados obtidos podem ser consultados na

Tabela 14.

Tabela 14 – Valores de viscosidade aparente obtidos da análise de 3 medições efectuadas à formulação SC02 e ao produto alvo Alpro Choco

Viscosidade aparente (cP) das bebidas de soja com cacau								
Amostras	Formulação SC02				Alpro (produto alvo)			
	20 rpm	30 rpm	50 rpm	60 rpm	20 rpm	30 rpm	50 rpm	60 rpm
Amostra 1	37,1	28,2	23,1	21,4	38,0	29,4	22,8	21,8
Amostra 2	36,9	27,2	22,0	21,6	38,5	28,8	22,9	21,3
Amostra 3	37,0	26,7	21,8	20,9	37,9	28,5	22,6	20,7
Média	37,0	27,37	22,30	21,30	38,1	28,9	22,8	21,3
Desvio Padrão	0,100	0,763	0,700	0,360	0,321	0,458	0,153	0,551

Legenda:

1 Centipoise (cP) = 1 mPa·s

O objetivo da medição da viscosidade aparente das formulações desenvolvidas e do produto alvo era verificar se as bebidas teriam viscosidades aparentes semelhantes, o que se atesta pela análise do **Gráfico 2**.

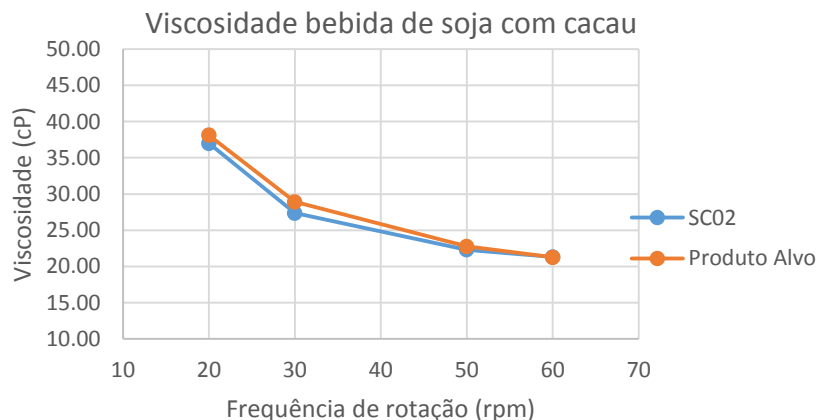


Gráfico 2 – Valores de viscosidade em bebidas de soja com cacau

9.2.4. Análise sensorial

No que respeita à formulação da bebida original os consumidores demonstraram preferência pela formulação 1 conforme se pode verificar no **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**

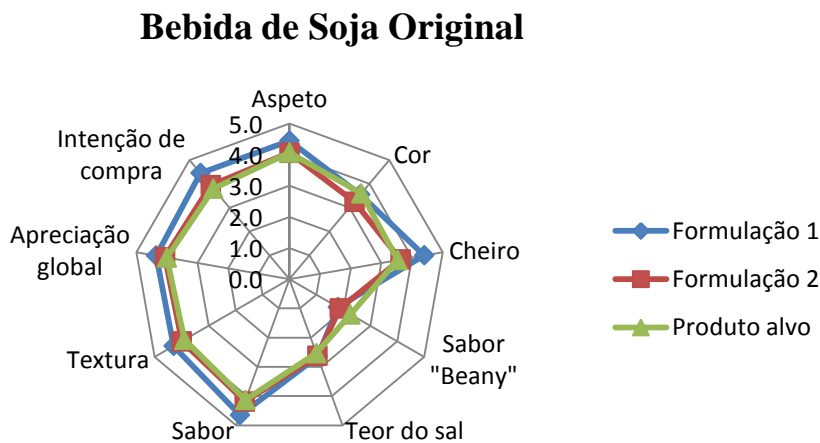


Gráfico 3 – Resultados da análise sensorial interna efectuada às duas formulações de bebida de soja original em estudo e ao produto alvo

Verifica-se que as diferenças entre as três formulações são praticamente nulas, por conseguinte realizou-se uma análise externa com painel alargado, para verificar se se obterão resultados diferentes. No entanto, à semelhança do painel interno, também o painel externo acabou por classificar a formulação em estudo muito próxima do produto alvo, pelo

que se considerou alcançado o objectivo de obter um produto competitivo sensorialmente com o produto alvo. Relativamente à bebida de soja com cacau, a formulação SC02 distinguiu-se em termos organoléticos das outras duas formulações conforme mostra o **Gráfico 4**, esta foi a formulação aprovada e será trabalhada comercialmente junto dos potenciais clientes.

Bebida de Soja com Cacau

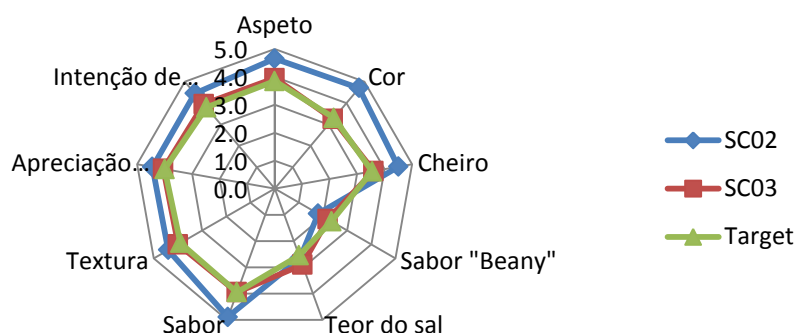


Gráfico 4 - Resultados da análise sensorial interna efectuada às duas formulações de bebida de soja com cacau em estudo e ao produto alvo

9.2.5. Microbiologia

Após produção, as amostras foram pré-incubadas a 30°C durante 5 dias, após esse período de tempo foi feito controlo microbiológico às amostras produzidas em linha aquando do ensaio industrial. Foram analisadas 100 amostras (embalagens de produto final), não tendo existido qualquer desenvolvimento microbiológico.

9.2.6. Ensaio de estabilidade

9.2.6.1. Bebida de soja natural

A realização deste ensaio permite então classificar as amostras como “a mais estável” e a “menos estável” através do módulo de análise do índice de instabilidade.

Na **Figura 15** apresentam-se os perfis de transmissão de cada uma das amostras, analisadas, e que se pretendem comparar em termos de estabilidade.

Amostra SN – 1ª Formulação da Nutre

Amostra Soy Natural – Formulação da marca ViveSoy

Amostra Alpro Natural – Formulação da marca Alpro

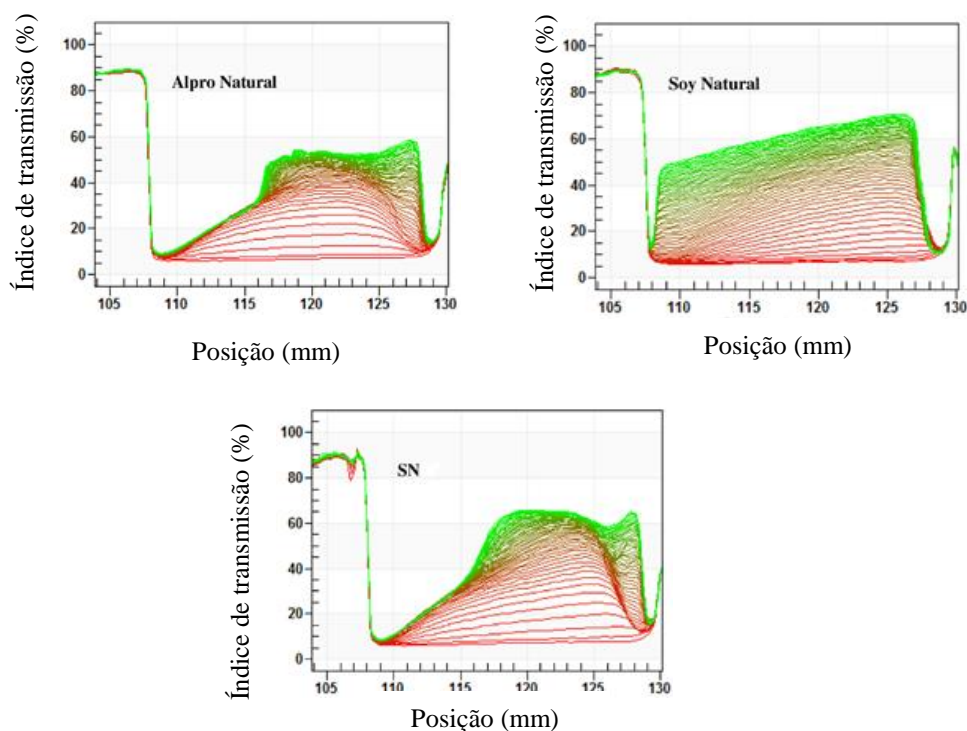


Figura 15 – Perfil de transmissão das amostras de bebida original em análise

Os perfis de transmissão são representativos da variação da concentração das partículas dentro da amostra (baixa transmissão significa alta concentração, alta transmissão significa baixa concentração) o que indica desestabilização do sistema.

Observando os perfis de transmissão pode-se concluir que as formulações SN e Alpro Natural são bastante semelhantes, tendo em conta que os perfis funcionam como “*finger-prints*” das amostras.

Também se pode afirmar que existe uma separação, característica de uma dispersão, onde a proteína sedimenta, e a gordura flutua formando uma camada de sobrenadante. A

Figura 16 mostra as diferenças de estabilidade entre as amostras, pelo índice de instabilidade.

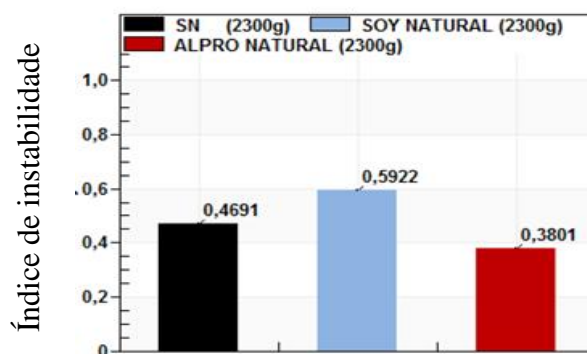


Figura 16 - Diferenças de estabilidade entre as amostras, com base no índice de instabilidade

Quanto maior o índice de transmissão, menor é a estabilidade da amostra. Pode-se concluir então, que a amostra Alpro Natural é mais estável, seguida da amostra SN e por fim, a menos estável, a Soy Natural.

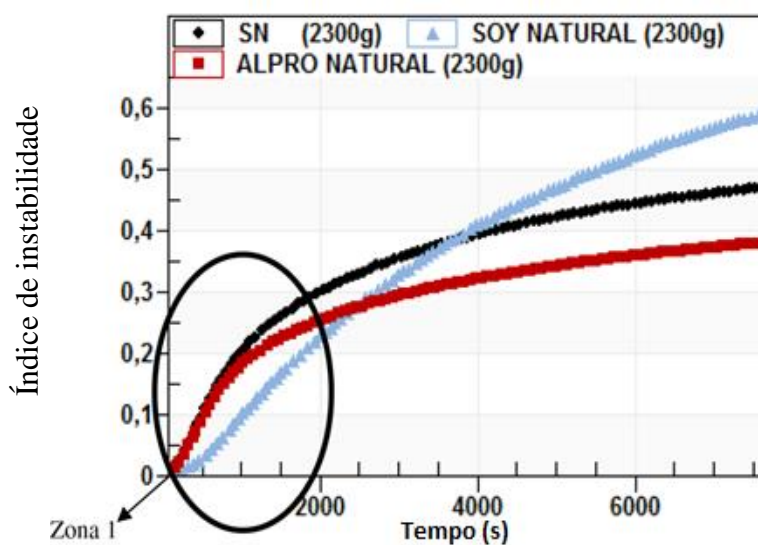


Figura 17 - Curva de separação da cada uma das amostras, em função do tempo do ensaio

Da análise da curva de separação das diferentes amostras (**Figura 17**) é possível verificar que na zona 1, que representa os primeiros 2000 s (40 minutos), a amostra Soy Natural é a mais estável, o que não se verifica no final do teste. Também constatamos que amostra SN está praticamente a par da amostra Alpro Natural.

Partindo do pressuposto que um ensaio a 2300g durante 2 horas corresponde aproximadamente a 1 ano, então, os primeiros 40 minutos correspondem aproximadamente a 4 meses. Ao considerar um período de quatro meses de validade, os resultados obtidos levam a concluir que a amostra Soy Natural é a mais estável, no entanto, como o objetivo se fixa num período mais longo, é necessário prolongar o ensaio.

Com o intuito de avaliar se a aceleração tem influência no comportamento das amostras foi efectuado um 2º ensaio, alterando a velocidade de 2300g para 575g, para clarificar esta questão.

Da análise da **Figura 18**, é possível verificar que os parâmetros apresentam uma diferença em relação ao 1º ensaio, tendo em conta um factor de 4 (2300/575). Quatro vezes menos aceleração e quatro vezes mais tempo, desta forma, reproduzimos a aproximação a 1 ano.

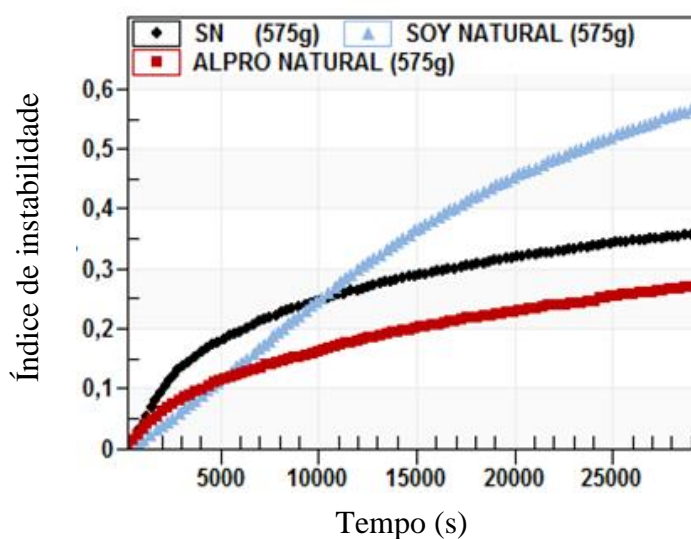


Figura 18 - Curva de separação para uma aceleração de 575g

Os resultados evidenciam o mesmo comportamento do 1º ensaio a 2300 g, mas com um pouco menos de separação, o que indica características reológicas que correspondem ao comportamento pseudoplástico.

Após a realização dos ensaios mencionados, pode-se afirmar que para períodos de tempo inferiores a 6 meses, a formulação Soy Natural tem uma melhor “performance” mas também se verifica uma velocidade de separação bastante superior às restantes. Pode-se

ainda concluir que a amostra mais estável é a Alpro Natural e que a amostra SN terá uma formulação muito semelhante, apesar de apresentar uma separação maior para as mesmas condições.

Com base nestas conclusões será atribuída uma validade de 9 meses, quer em termos de estabilidade, quer em termos microbiológicos, ao produto em desenvolvimento, e prosseguir com estudo de vida útil em tempo real de forma a validar este período como data de validade do produto desenvolvido.

9.2.6.2. Bebida de soja com cacau

Após submeter as amostras de bebida de soja com cacau a uma rotação de 2300g durante aproximadamente 2 horas e à temperatura ambiente foi possível obter os perfis de transmissão, que figuram na **Figura 19**.

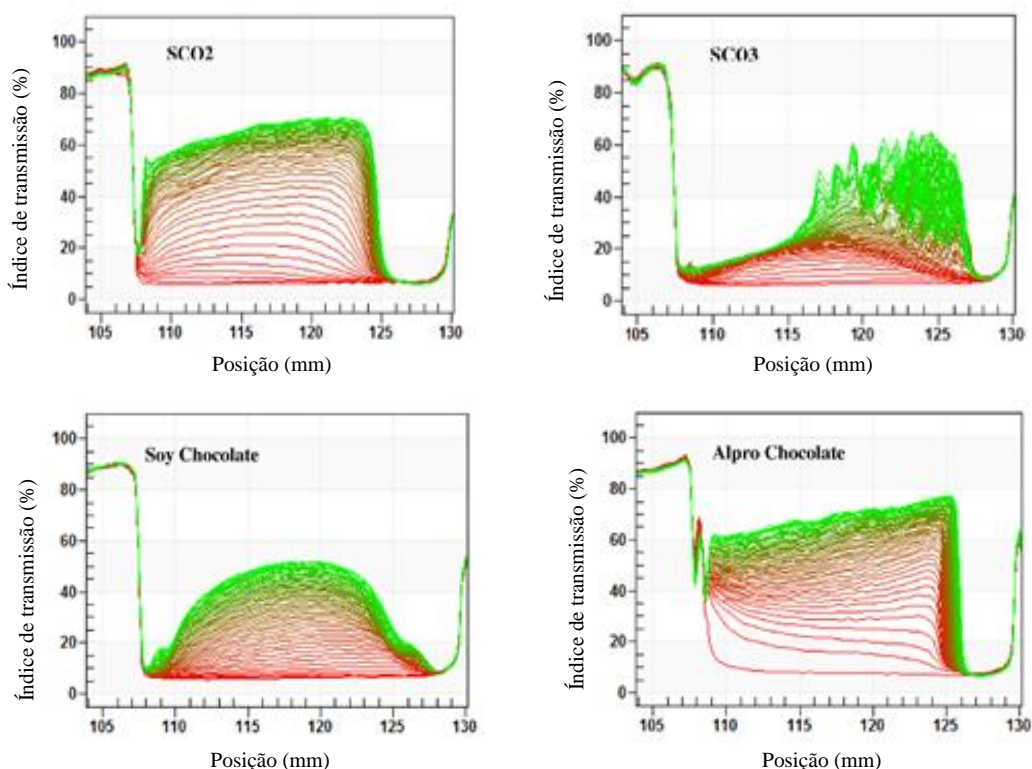


Figura 19 - Perfis de transmissão de cada uma das amostras de bebida de soja com cacau

Da análise dos perfis de transmissão das diferentes amostras analisadas, é possível constatar que as amostras SC02 e a Alpro Choco, apresentam comportamento semelhante, podendo concluir-se que as suas formulações são aproximadas, uma vez que apresentam o mesmo tipo de separação (sedimentação) criando uma porção de sedimento bastante pronunciada, como se pode verificar na imagem da célula utilizada no ensaio **Figura 20**. As setas fazem a correspondência das diferentes fases da amostra, que se encontra dentro da célula, e o gráfico gerado durante o ensaio.

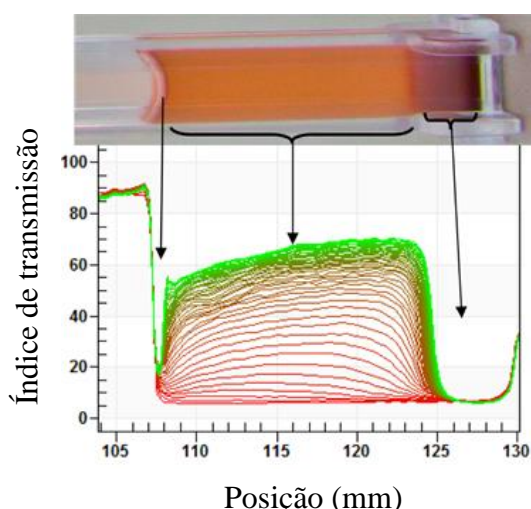


Figura 20 - Célula com amostra em análise e correspondência do gráfico gerado com as respectivas fases

Considerando a amostra Soy Choco, esta apresenta características de dispersão apresentando sedimentação e flutuação de partículas e, à partida, tem um comportamento semelhante à SC03, embora esta apresente um formato de perfis que indicam alguma interferência. Estes perfis, são consequência de agregação de partículas, o que se verificou no final no ensaio, quando observámos a célula com a amostra. Observaram-se perfeitamente os agregados que correspondem aos últimos sinais de transmissão.

Recorrendo novamente ao índice de instabilidade, confrontamos todas as amostras e os resultados encontram-se na **Figura 21**.

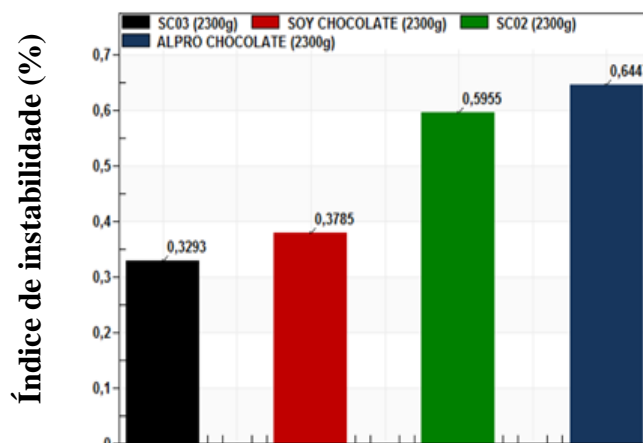


Figura 21 – Comparação do índice de instabilidade das diferentes amostras em análise

Observam-se dois grupos (SC03 e SoyChoco/ SC02 e AlproChoco), que mais uma vez evidenciam a proximidade de formulações (informação também extraída da análise dos perfis de transmissão), e também os diferentes graus de separação com a SC03 e a SoyChoco muito próximas, mas com a SC03 a apresentar valores de estabilidade melhores, e as menos estáveis a SC02 e a AlproChoco, esta última a menos estável. No entanto, é necessário analisar a agregação de partículas da amostra SC03, como um factor de instabilidade acrescido, que a amostra SoyChoco não apresenta. Análises posteriores, serão necessárias para avaliar este efeito.

Podemos contudo, observar na **Figura 22** a evolução da separação em função do tempo, que oferece uma informação detalhada sobre a separação das amostras.

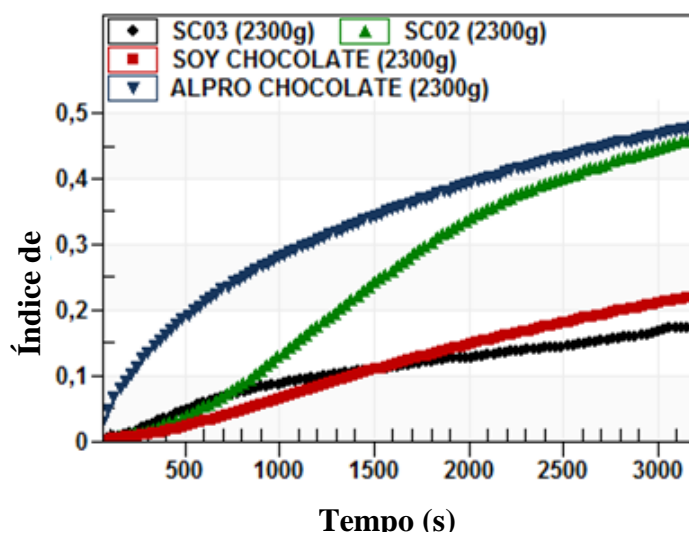


Figura 22 – Evolução da separação das amostras em função do tempo

Concentrando as atenções nas amostras SC03 e SoyChoco, pode-se concluir que, testes de estabilidade com tempos inferiores a 4 meses podem conduzir a conclusões precipitadas/erradas.

No par SC02 e AlproChoco, observa-se uma resistência inicial na separação da amostra SC02, que gradualmente se aproxima da AlproChoco. Em termos de listagem de ingredientes as duas formulações são constituídas pelos mesmos ingredientes, nomeadamente, em termos de estabilizadores, assim sendo, a validade atribuída à formulação SC02 é de 9 meses.

A validação do período de durabilidade mínima será efectuada através de um estudo de vida útil em tempo real por um laboratório externo.

9.2.7. Estudo de vida útil em tempo real

De acordo com o estudo de vida útil efectuado foi possível verificar que o produto sofre alterações consideráveis a partir dos 9 meses de validade (**Tabela 15**), por pode concluir-se que será necessário melhorar a formulação no sentido de obter um produto mais estável, para tentar atingir um período de validade de 12 meses.

Tabela 15 – Evolução das características organolépticas do produto

4.1.1. Evolução das características organolépticas do produto

Condições de envelhecimento	Período em envelhecimento	Classificação (escala 1 a 7)			
		Aspeto e cor	Odor	Flavor	Textura
Tª e HR ambiente	Controlo inicial	7	7	7	7
	C ₁ : 2 meses	7	7	7	7
	C ₂ : 4 meses	6 ^{A.1.}	6 ^{O.1.}	6 ^{F.1.}	7
	C ₃ : 5,4 meses	6	6	6/5 ^{F.2.}	7
	C ₄ : 8 meses	6/5 ^{A.2.}	6/5 ^{O.2.}	4 ^{F.3.}	7
30°C – 65% HR	C ₁ : 1 mês	7	7	7	7
	C ₂ : 2 meses	7	6 ^{O.1.}	6 ^{F.1.}	7
	C ₃ : 2,7 meses	6 ^{A.1.}	6	6	7
	C ₄ : 4 meses	6/5 ^{A.2.}	4 ^{O.3.}	4 ^{F.3.}	6 ^{T.1.}
40°C – 75% HR	C ₁ : 0,5 meses	7	7	7	7
	C ₂ : 1 mês	7	7	7	7
	C ₃ : 2 meses	7	5 ^{O.2.}	5 ^{F.2.}	7
	C ₄ : 2,7 meses	6/5 ^{A.2.}	4 ^{O.3.}	4 ^{F.3.}	6 ^{T.1.}

Comentários:

^{A.1.)} Aspeto muito ligeiramente diferente do padrão de referências.

^{A.2.)} Aspeto ligeiramente diferente do padrão de referência (acastanhado).

^{O.1.)} Perda muito ligeira do odor, face ao padrão inicial.

^{O.2.)} Perda entre ligeira e moderada do odor (face ao padrão inicial), com aparecimento de odores atípicos em ligeira intensidade.

^{O.3.)} Odor moderadamente diferente do padrão de referência, com aparecimento notório de odores atípicos.

^{F.1.)} Perda muito ligeira do flavor, face ao padrão inicial.

^{F.2.)} Perda entre ligeira e moderada do flavor (face ao padrão inicial), com aparecimento de sabores atípicos entre ligeira e moderada intensidade.

^{F.3.)} Perda notória do flavor (face ao padrão inicial), com aparecimento de sabores atípicos em notória intensidade.

^{T.1.)} Produto muito ligeiramente mais viscoso. Aparecimento mais grosso.

9.3. Sobremesa fermentada de soja

9.3.1. Formulação

No que respeita à sobremesa fermentada de soja, na **Tabela 16** e na **Tabela 17**, é possível verificar o levantamento efectuado na pesquisa de mercado, no que respeita à declaração nutricional e listagem de ingredientes dos produtos fabricados pelas principais marcas de fabricantes e distribuidores. Da análise das mesmas pode verificar-se que as formulações mais aproximadas são as da marca SojaSun e Joya, e quando comparamos as formulações de marca de distribuidor, é visível a semelhança entre os produtos da marca Auchan e Área Viva.

Tabela 16 – Comparação declaração nutricional e listagem de ingredientes, marca de fornecedor (MDF)


Declaração nutricional por 100g	Alpro	Sojasun	Joya
Energia	212kJ / 50kcal	192 kJ /46 kcal	209 kJ / 50 kcal
Lípidos	2,3g	2,7g	2,6g
<i>Dos quais:</i>			
Saturados	0,4g	0,4g	0,4g
Monoinsaturados	0,5g	0,7g	Não menciona
Polinsaturados	1,4g	1,6g	Não menciona
Hidratos de carbono	2,1g	0,7g	1,5g
<i>Dos quais: açúcares</i>	2,1g	0,7g	0,4g
Fibra	1g	0,3g	
Proteína	4g	4,6g	4,7g
Sal	0.25g	0,08g	0,07g
Vitaminas			
Vit. D	0.75µg15%*	Não menciona	Não menciona
Vit. B12	0.38µg15%*	Não menciona	Não menciona
Sais minerais			
Cálcio	120mg15%*	120mg15%*	Não menciona
	* = dos valores de referência do nutriente		
Ingredientes	Água, grãos de soja descascados (7,9%), açúcar, citrato tricálcico, estabilizador (pectina), reguladores de acidez (citrato de sódio, ácido cítrico), aroma, sal marinho, antioxidantes (extrato rico em tocoferóis, palmitato de ascorbilo), fermentos vivos de iogurte (<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>), vitaminas (B12, D2).	Base de soja (água e grãos de soja), fosfato de calcium, fermentos selecionados dos quais Bifidus e Acidophilus.	Base de soja 99,2% (água, grãos de soja 11%), amido de milho, culturas de iogurte

Tabela 17 - Comparação declaração nutricional e listagem de ingredientes, marca de distribuidor (MDD)

Declaração nutricional por 100g	Pingo Doce Frutos vermelhos	Continente Frutos vermelhos	Auchan Frutos vermelhos
Energia	355 kJ/ 84kcal	324 kJ/ 77kcal	326 kJ/ 77kcal
Lípidos	2,3 g	1,7 g	1,7 g
<i>Dos quais:</i>			
Saturados	0,4 g	0,3 g	0,3 g
Monoinsaturados	Não menciona	Não menciona	Não menciona
Polinsaturados	Não menciona	Não menciona	Não menciona
Hidratos de carbono	11,8 g	11,6 g	11,7 g
<i>Dos quais: açúcares</i>	11,0 g	10,5 g	10,6 g
<i>Dos quais: lactose</i>	< 0,05 g	----	----
Fibra	1,0 g	1,4 g	1,4 g
Proteína	3,6 g	3,1 g	3,1 g
Sal	0,1 g	0,08 g	0,08 g
Vitaminas			
Vit. D	0,75µg	Não menciona	Não menciona
Vit. B12	0,38 µg	Não menciona	Não menciona
Vit. B2	0,21 mg	Não menciona	Não menciona
Vit. E	2 mg	2 mg	1,8 mg
Sais minerais			
Cálcio	120mg15%*	120mg15%*	120mg15%*
Ingredientes	Água, açúcar, grãos de soja (8,5%), morangos (7%), sumo de morango concentrado (4%), citrato de cálcio, amido de milho, espessantes (pectina, farinha de semente de alfarroba), sumo de cenoura concentrado, acidificante (ácido cítrico), regulador de acidez (citrato de sódio), vitaminas (B2, B12, D), aroma, fermentos lácticos (<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>).	Preparado de soja (76,7%) (água, grãos de soja), frutos silvestres e vermelhos (10%) (morango, mirtilo, framboesa, amora), açúcar, amido modificado de tapioca, fosfato de cálcio, aroma, espessante (pectina), sal, bactérias lácticas, vitamina E.	Bebida de soja (76,7%) (água, feijão de soja), frutos (10%) (framboesas, amoras, mirtilos, morangos), açúcar (9,8%), amido modificado de tapioca, sais de cálcio do ácido ortofosfórico, aromas, espessante (E440), reguladores de acidez (E331, E300), sal, fermentos selecionados, vitamina E.

No que respeita à formulação desenvolvida foi possível verificar que após repetirmos os ensaios laboratoriais com as 4 formulações, e acompanhando o seu comportamento através da variação do pH, constatou-se que a formulação que permitiu a fermentação do preparado de soja foi a 4ª formulação, obtendo-se um gel com consistência aproximada a um iogurte batido. Por conseguinte, essa foi a formulação considerada e após novo ensaio, foram

controlados os parâmetros físico-químicos quer internamente, quer em laboratório externo (**Figura 23**) de forma a validá-la do ponto de vista nutricional, ou seja, de forma a ser possível verificar se a formulação definida permite a obtenção de um produto nutricionalmente aproximado ao produto alvo.




SILLIKER
a Mérieux NutriSciences Company

BOLETIM ANALÍTICO N° 22514/EGI/14	
<p>PRODUTO: SOBREMESA REFERÊNCIA: YOFU NATURAL ACONDICIONAMENTO: Embalagem de origem DATA DA RECEÇÃO: 2014/04/03 AMOSTRA: 2014/019881 MARCA: FORNECEDOR: DATA EMB./FABRICO: CAPACIDADE: - DATA DE VALIDADE: LOTE: 310314</p>	<p>NUTRE INDUSTRIAS ALIMENTARES, S.A. Zona Industrial de Vagos Lote 104 3840-385 VAGOS N° CLIENTE:</p>
<p>DATA DA COLHEITA: LOCAL: SECÇÃO:</p>	

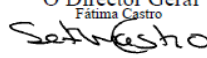
RESULTADOS ANALÍTICOS				
DETERMINAÇÃO	MÉTODO	DATA DE INÍCIO	RESULTADO	UNIDADE
Det de humidade	PAFQ 120.0 *	2014/04/04	83,2	g/100g
Det de proteína bruta (F=6.25)	PAFQ 063.0	2014/04/04	4,05	g/100g
Det de matéria gorda	PAFQ 069.0	2014/04/04	4,67	g/100g
Det de cinza total	PAFQ 060.1	2014/04/04	0,88	g/100g
Det de fibra alimentar	PAFQ 230.1	2014/04/04	0,4	g/100g
Det de hidratos de carbono	Dir CE 90/496 *	2014/04/03	6,8	g/100g
Det de valor energético	Dir CE 90/496 *	2014/04/03	86,2	kcal/100g
Det de valor energético, exp kJ/100g	Dir CE 90/496 *	2014/04/03	360,4	Kj/100g
Det de açúcares totais (HPLC)	PAFQ 084.2	2014/04/04	45,9	g/kg
Det de ácidos gordos monoinsaturados	PAFQ 201.0 *	2014/04/04	1,4	g/100 g
Det de ácidos gordos polinsaturados	PAFQ 201.0 *	2014/04/04	2,6	g/100 g
Det de ácidos gordos saturados	PAFQ 201.0 *	2014/04/04	0,7	g/100 g
Det de sódio, AA	PAFQ 008.0	2014/04/04	203	mg/kg
Det de sal (cálculo)	PAFQ 390.0	2014/04/03	0,051	g/100g
Contagem de bolores	NF V 08-059:02	2014/04/03	<1	UFC/ml
Contagem de leveduras	NF V 08-059:02	2014/04/03	<1	UFC/ml

Observações/Avaliação da conformidade:
Colheita da responsabilidade do cliente. * - Método não acreditado. Teor de sorbato de potássio equivalente a 91 g/kg.

NOTA: O boletim analítico refere-se apenas às amostras analisadas, não podendo ser generalizado a partidas ou lotes, salvo nos casos especificamente mencionados. Este documento é considerado confidencial, não podendo ser reproduzido a não ser na íntegra, nem utilizado para fins publicitários, sem a nossa prévia autorização escrita.



IQ.09.0
pág 1 de 1

Data de emissão: 2014/04/21
O Director Geral
Fátima Castro


SILLIKER PORTUGAL, S.A.
Rua Industrial dos Terços, 44
4410-477 Canelas - V. N. Gaia
Tel. (+351) 22 715 08 20
info@silliker.pt
www.silliker.pt

Figura 23 – Boletim analítico da 4ª formulação de sobremesa fermentada de soja

Da comparação constatou-se que a formulação selecionada é próxima da formulação alvo apenas no que respeita ao teor de proteína, como se pode verificar na **Tabela 18**. Tais diferenças, nomeadamente em termos de lípidos e hidratos de carbono podem estar relacionadas com as características intrínsecas do grão de soja, mas também com ajustes que serão necessários fazer à formulação aquando da realização do ensaio industrial.

Tabela 18 – Comparação de resultados nutricionais

Declaração nutricional por 100g	Ensaio interno	Ensaio externo REL2014_022514	Produto alvo Alpro Natural
Energia	---	360,4 kJ /86,2 kcal	212kJ / 50kcal
Lípidos	4,61g	4,67g	2,3g
<i>Dos quais:</i>			
Saturados	---	0,7g	0,4g
Monoinsaturados	---	1,4g	0,5g
Polinsaturados	---	2,6g	1,4g
Hidratos de carbono	---	6,8g	2,1g
<i>Dos quais: açúcares</i>	---	4,59g	2,1g
Fibra	---	0,4g	1g
Proteína	4,06g	4,05g	4g
Sal	---	0,05g	0.25g
Outros parâmetros			
Humidade	83,0g	83,2g	
Cinza total	0,86g	0,88g	

9.3.2. Controlo de parâmetros físico-químicos ao longo do período de armazenamento da sobremesa fermentada de soja

A formulação seleccionada (4ª formulação) foi submetida a controlo físico-químico e microbiológico ao longo do período de armazenamento a temperatura refrigerada, no sentido de avaliar-se o comportamento do produto em estudo. Os resultados dessas medições encontram-se compilados na **Tabela 19**. Os resultados obtidos para cada um dos parâmetro físico-químico analisados serão discutidos individualmente nos pontos seguintes.

Tabela 19 – Controlo de parâmetros físico-químicos durante período de armazenamento

Parâmetros físico-químicos avaliados durante o período de armazenamento a temperatura entre 0 e 5°C																		
	Sólidos Solúveis (°Bx)	Média	Desvio padrão	pH	Média	Desvio padrão	Humidade (%)	Média	Desvio padrão	Viscosidade (cP) (4 RPM)	Média	Desvio padrão	Densidade (g/cm ³)	Média	Desvio padrão	Acidez (g ácido lático/100g)	Média	Desvio padrão
0	10,9	10,90	0,0058	4,53	4,52	0,0058	85,43%	85,44%	0,0001	5511	5530,0	43,715	1,04	1,040	0,0000	0,96	0,9567	0,0058
	10,91			4,52			85,44%			5580			1,04			0,95		
	10,9			4,52			85,44%			5499			1,04			0,96		
8	10,9	10,89	0,0100	4,5	4,50	0,0058	85,42%	85,42%	0,0000	5488	5585,0	96,504	1,04	1,040	0,0000	0,98	0,9733	0,0115
	10,89			4,49			85,42%			5681			1,04			0,96		
	10,88			4,5			85,42%			5586			1,04			0,98		
16	10,85	10,84	0,0173	4,49	4,48	0,0058	85,43%	85,43%	0,0001	4964	5424,7	400,570	1,04	1,040	0,0000	1,06	1,0333	0,0306
	10,82			4,48			85,42%			5691			1,04			1,00		
	10,85			4,48			85,44%			5619			1,04			1,04		
24	10,9	10,88	0,0252	4,48	4,46	0,0153	85,39%	85,39%	0,0001	5101	5167,3	287,302	1,04	1,040	0,0000	1,11	1,1267	0,0153
	10,88			4,45			85,40%			4919			1,04			1,14		
	10,85			4,46			85,38%			5482			1,04			1,13		
32	10,71	10,71	0,0153	4,47	4,47	0,0058	85,35%	85,36%	0,0002	5721	5615,7	102,163	1,04	1,043	0,0058	1,11	1,1033	0,0115
	10,7			4,47			85,38%			5517			1,04			1,09		
	10,73			4,48			85,35%			5609			1,05			1,11		

9.3.2.1. Acidez titulável

No iogurte, a temperatura de incubação tem uma grande influência ao nível da acidez, pois esta varia com a mesma, no entanto, é importante ocorrer o desenvolvimento da cultura láctea durante o armazenamento a frio. Outro factor importante para a definição da qualidade do iogurte é a relação entre *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, o equilíbrio entre acidez, aroma e sabor, depende do controlo da razão entre os mesmos. Acidez e temperatura de incubação elevadas favorecem os bacilos em relação aos cocos, com acidez e temperatura de incubação baixas, ocorre o inverso (Martin 2002).

No caso dos iogurtes de leite, de acordo com (Souza 1991) também o teor de sólidos do leite influencia fortemente a acidez titulável, logo, o pH é o melhor parâmetro para expressar a acidez do iogurte. O mesmo autor defende ainda, que a acidez do iogurte é muito variável, sendo bastante influenciada pelo paladar do consumidor. Valores entre 0,7 a 1,25% de ácido láctico ou pH entre 3,7 e 4,6 são comuns. Ideal seria obtermos um produto no intervalo de 0,7 a 0,9% de acidez, ou, pH entre 4,0 e 4,4, para que o produto obtido não fosse insípido nem excessivamente ácido ou amargo.

Da análise de resultados expostos na Tabela 19, verifica-se que durante o período de armazenamento a acidez aumenta ligeiramente alcançando um valor máximo de 1,11% ao 32º dia, valor este comum, e não muito distante dos valores ideais referidos acima. O facto da acidez aumentar ligeiramente ao longo do tempo de armazenamento poderá estar relacionado com a persistente actividade metabólica das bactérias lácticas – pós acidificação.

Os valores de pH obtidos ao 32º dia de armazenamento refrigerado são concordantes com as afirmações acima citadas, no que respeita à acidez e como comentado anteriormente verifica-se que esta se encontra ligeiramente acima do intervalo de valores ideais citados, contudo esta diferença não parece ser percebida aquando da análise sensorial.

9.3.2.2. pH e Sólidos Solúveis

Durante a fermentação láctica, uma das alterações verificadas é a produção de ácido láctico, a qual provoca uma diminuição do pH ao longo do período de fermentação. Assim, o valor de pH é um parâmetro de fácil medida e relevante para

monitorizar a produção de ácidos durante o processo de fermentação. De acordo com a ficha técnica da cultura utilizada nos ensaios laboratoriais é expectável que a fermentação decorra e que a curva de fermentação seja semelhante à que se encontra na **Figura 24**.

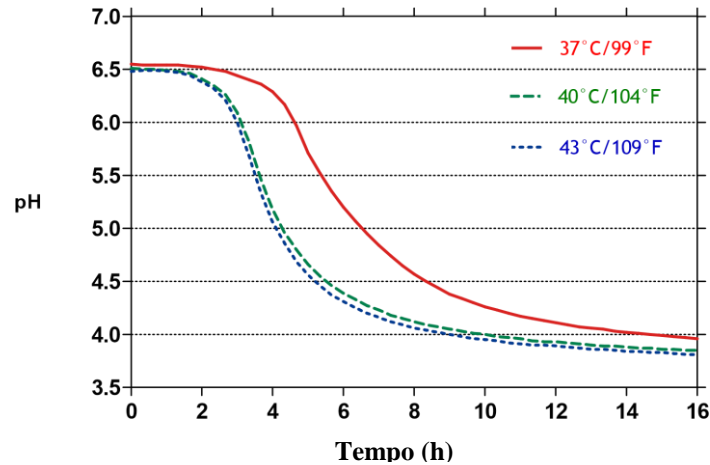


Figura 24 – Curva de fermentação tipo (CHR-Hansen 2011)

Pela análise das curvas de fermentação dos ensaios laboratoriais que se encontram no **Gráfico 5**, verifica-se que a formulação que permitiu a obtenção de um produto fermentado com pH próximo do valor definido como alvo e com uma curva de fermentação próxima da esperada, foi a 4ª formulação, pelo que será o produto resultante desta formulação o estudado.

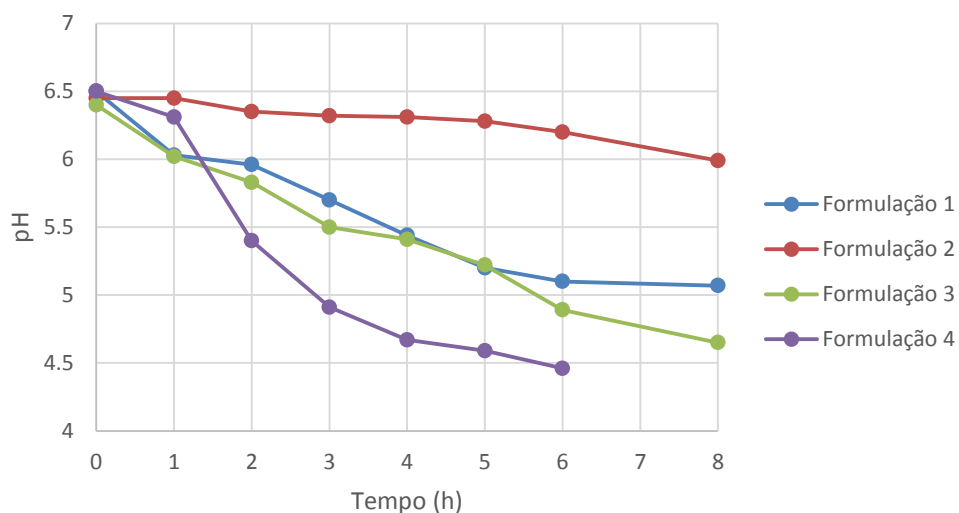


Gráfico 5 – Curvas de fermentação das formulações laboratoriais

Foram determinados os valores de pH, acidez titulável e viscosidade, durante a fermentação, valores que podem ser consultados na **Tabela 20**, tendo-se constatado que o pH e os sólidos solúveis totais diminuem (**Tabela 21**).

Tabela 20 – Variação de pH durante o processo de fermentação

pH					
Tempo (horas)	1ª Formulação	2ª Formulação	3ª Formulação	4ª Formulação	pH produto final
0	6,50	6,45	6,4	6,50	
1	6,03	6,45	6,02	6,31	
2	5,96	6,35	5,83	5,4	
3	5,7	6,32	5,50	4,91	4,46
4	5,44	6,31	5,41	4,67	
5	5,20	6,28	5,22	4,59	
6	5,10	6,20	4,89	4,46	
8	5,07	5,99	4,65	---	

Tabela 21 – Resultados dos controlos físico-químicos efectuados em triplicado à 4ª formulação, durante o processo fermentativo

Análises efectuadas à 4ª formulação durante processo fermentativo																
Amostras	Acidez (g ácido láctico/ 100g)						Viscosidade 4 rpm (cP)					Sólidos solúveis totais (°Bx)				
	0 h	1h	2h	3h	4h	6h	0 h	1h	2h	4h	6h	0 h	1h	2h	4h	6h
Tempo de fermentação																
Amostra 1	0,25	0,29	0,58	0,67	0,78	0,86	31	92	744	910	3320	13,76	13,58	12,6	11,24	10,9
Amostra 2	0,26	0,31	0,6	0,69	0,78	0,85	30	90	741	908	3287	14,21	13,97	12,81	11,73	10,91
Amostra 3	0,25	0,32	0,61	0,72	0,76	0,86	33	90	740	909	3292	13,88	13,46	12,34	11,55	10,9

Por outro lado a acidez titulável (**Tabela 21** e **Gráfico 6**) e a viscosidade (**Tabela 21** e **Gráfico 7**) aumentam neste período, caracterizando assim o processo fermentativo por meio das bactérias lácteas utilizadas, em que existe consumo de sólidos solúveis do extrato hidrossolúvel de soja para produção de ácidos que reduzem o valor do pH. Com estas avaliações foi possível determinar o tempo de aproximadamente seis horas como tempo final de fermentação, obtendo-se um pH de 4,46, pois segundo (**Umbelino et al. 2001**), o pH ideal situa-se no intervalo de 4,50 a 4,60. Para além disso, o valor de pH do produto alvo é de 4,5, que era o valor que pretendíamos obter.

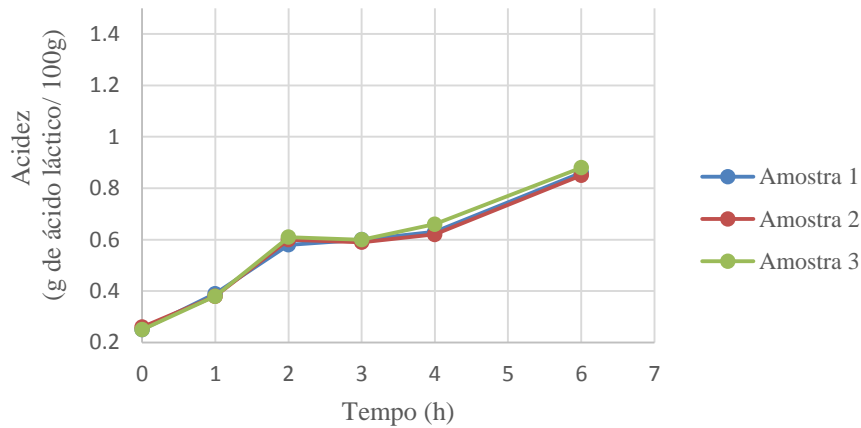
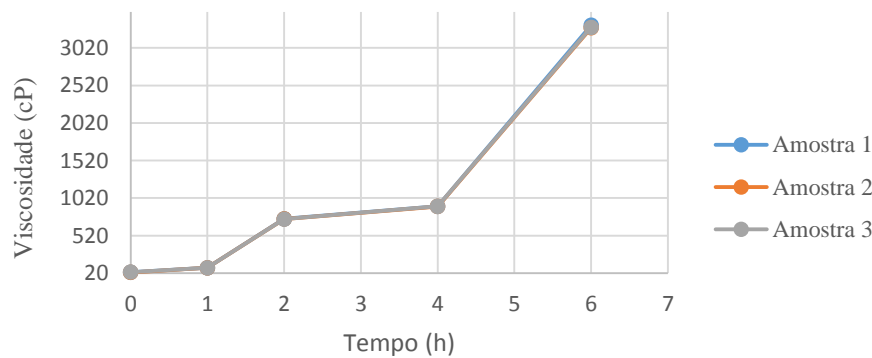


Gráfico 6 – Variação de acidez durante a fermentação



Legenda: cP - centipoise

Gráfico 7 - Variação da viscosidade durante o processo fermentativo

9.3.2.3. Viscosidade aparente

O aumento da viscosidade aparente ao longo da fermentação, para além doutros aspectos tais como teor de sólidos, está relacionada com o desempenho da cultura fermentativa utilizada, que para além do seu papel primário (produção de ácido láctico para baixar o pH), certas estirpes de bactérias produtoras de ácido láctico contribuem também para a estrutura física do iogurte (**Rohm and Kovac 1994**) e (**Vlahopoulou and Bell 1993**), através da produção de polissacarídeos extracelulares, em iogurte batidos. Em bebidas com baixo teor de sólidos a produção de polissacarídeos pode melhorar a viscosidade e textura, aumentar a resistência à manipulação mecânica e diminuir a susceptibilidade à sinérese (expulsão de líquido intersticial devido à associação das moléculas de proteína e de retração de uma rede de gel no iogurte)

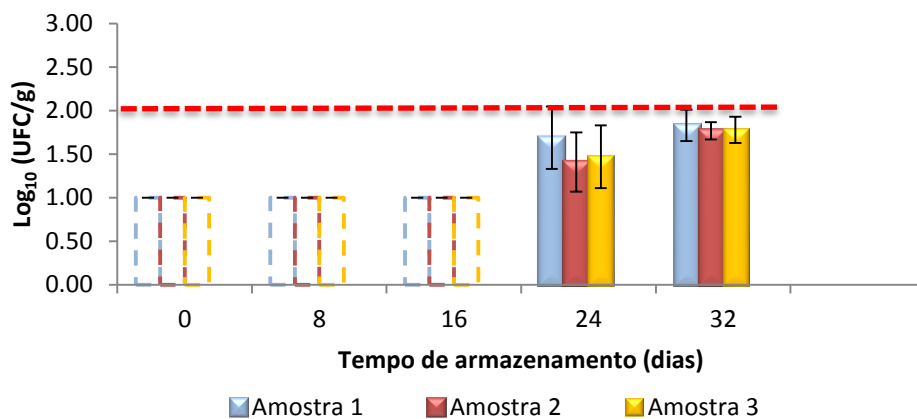
(Zourari and Desmazeaud 1992) e (Haqueand and Morris 2001), contudo, é difícil de estabelecer uma boa correlação entre a quantidade de polissacarídeos produzidos e a viscosidade correspondente, que pode ser devido a alterações na configuração tridimensional dos polímeros e das suas interações com alguns componentes do leite, principalmente caseínas, que precipitam a um pH baixo (Olsen 1989).

Os resultados expressos no **Gráfico 7** e no **Gráfico 2** mostraram que, como a viscosidade aparente do iogurte e das bebidas de soja diminui com a frequência de rotação do viscosímetro (propriedade esta diretamente proporcional à taxa de deformação), quer o iogurte quer a bebida de soja apresentam um comportamento pseudoplástico (Guimarães 2014).

9.3.3. Microbiologia

A formulação em análise foi submetida a controlo microbiológico durante o período de armazenamento refrigerado, tendo-se analisado bolores e leveduras, e também mesófilos aeróbios totais. No caso dos bolores e leveduras, os resultados obtidos podem ser consultados no **Gráfico 8**, onde se verifica o aparecimento dos mesmos verifica-se o aparecimento destes microrganismos ao 24º dia de armazenamento sendo possível verificar o aumento de crescimento ao 32º dia, no entanto, ainda sem alcançar o valor máximo permitido por lei (Ministério 1992).

Bolores e Leveduras



Legenda: Barras em branco e a tracejado indicam que não foi possível detetar estes microrganismos, uma vez que as contagens foram inferiores ao limite de deteção (<1,00 Log (UFC/g))

Gráfico 8 - Contagem de bolores e leveduras em sobremesa fermentada de soja durante período de armazenamento de 32 dias.

No que se refere às análises de quantificação de microrganismos mesófilos aeróbios totais, os resultados obtidos podem ser consultados no **Gráfico 9**, onde se verifica a presença destes microrganismos desde o dia zero, ocorrendo crescimento no decorrer do período de armazenamento refrigerado, sendo que no 32º dia o valor é ligeiramente inferior ao limite de 6Log_{10} UFC/g, valor a partir do qual podem ocorrer processos de deterioração dos produtos e consequente diminuição do tempo de vida útil do alimento.

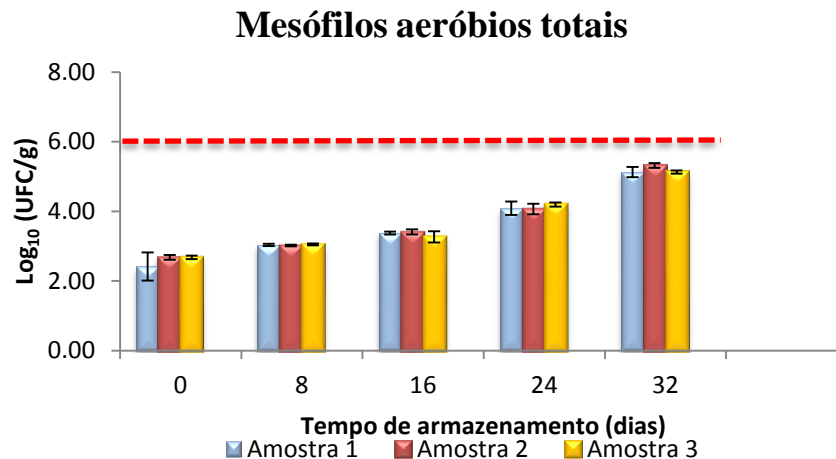


Gráfico 9 - Contagem de microrganismos totais em sobremesa fermentada de soja durante período de armazenamento de 32 dias

O aparecimento dos microrganismos mesófilos totais, bem como bolores e leveduras, pode estar relacionado com o facto de as amostras serem produzidas em laboratório, podendo ter ocorrido algum tipo de contaminação, por exemplo: através de utensílios ou até pelo ar. No caso dos bolores e leveduras, o seu aparecimento também poderá estar relacionado com abuso de temperatura durante o período de armazenamento.

Para além do controlo microbiológico acima descrito foram também efectuadas contagens de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, ao longo do período de armazenamento de forma a verificar se é estes microrganismos permanecem vivos e em que quantidades.

Da contagem de *Streptococcus thermophilus*, expressa no **Gráfico 10** e dos *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, **Gráfico 11** foi possível constatar o predomínio do *S. thermophilus* em relação aos *L. bulgaricus* durante o tempo de armazenamento refrigerado da sobremesa fermentada de soja, conforme se pode

constatar no **Gráfico 12**. Tal facto pode ser explicado pela proporção inicial entre os dois microrganismos na cultura empregue, isto é, as culturas lácticas comerciais têm como objectivo aumentar o tempo de prateleira dos iogurtes, e se existir predominância de lactobacilos, os iogurtes apresentam maior pós-acidificação durante o armazenamento, o que é indesejável. Por outro lado, este desequilíbrio torna-se também necessário, para minimizar problemas criados pelos eventuais abusos de temperatura que o produto possa sofrer na cadeia de frio (**Pinto 2001**).

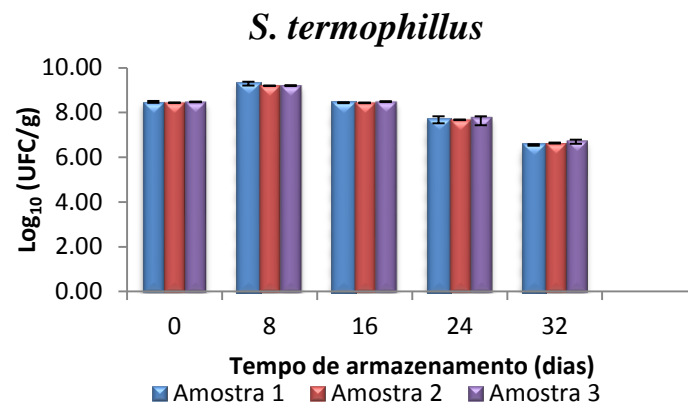


Gráfico 10 – Contagem de *S. termophilus* ao longo do tempo de armazenamento de 32 dias

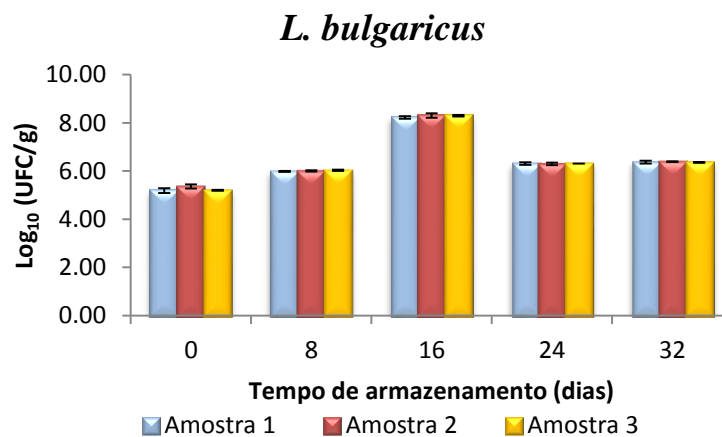


Gráfico 11 - Contagem de *L. bulgaricus* ao longo do tempo de armazenamento de 32 dias

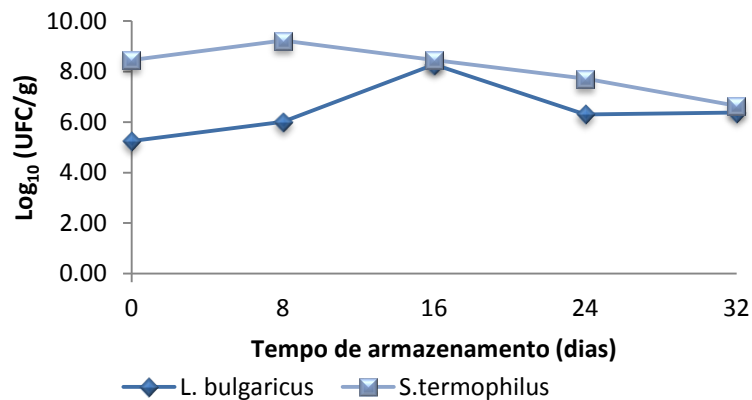


Gráfico 12 - Variação de *L. bulgaricus* versus *S. thermophilus* ao longo do tempo de armazenamento de 32 dias

Outro aspecto que influencia a diferença entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* está relacionado com o pH da sobremesa de soja durante o período de armazenamento (**Tabela 19**). Verifica-se que ao longo do tempo de armazenamento o pH sofre um ligeiro decréscimo, e no início é visível a predominância dos cocos face aos lactobacilos (**Gráfico 12**), este comportamento poderá estar relacionado com a facilidade dos cocos se desenvolverem em meios com pH mais alto, ficando os *L. bulgaricus* dependentes de condições do meio conseguidas pelos *S. thermophilus*, tais como, abaixamento de pH, produção de ácido fórmico, diminuição de oxigénio e redução do potencial de oxirredução, para começar a desenvolver-se – mecanismo de protocooperação que se estabelece entre os dois microrganismos. Contudo, ao 16º dia de armazenamento constata-se o crescimento de *L. bulgaricus*, por outro lado verifica-se uma diminuição do *S. thermophilus*, no entanto mantêm-se a predominância do mesmo. Tal facto poderá estar relacionado com aspectos relatados por (**Mital et al. 1974**), nomeadamente a capacidade dos Streptococos para desdobrar a sacarose presente na soja o que terá contribuído para uma maior quantidade de glucose presente no meio o que terá favorecido o crescimento dos lactobacilos (**Wang et. al 1994**), pois estes crescem bem em meio com adição de glucose. Ao longo do tempo de armazenamento embora predomine a quantidade de *S. thermophilus* verifica-se que existe redução das contagens de bactérias lácticas, no entanto, o valor final é superior a 5×10^7 , valor definido legalmente para os iogurtes (**Ministério 1992**).

9.3.4. Análise sensorial

Durante o processo de fermentação ocorre além da produção de ácido láctico como produto principal, diacetil, acetonas, ácido acético e acetaldeído, sendo este último o principal composto aromático ligado à formação do sabor e aroma característicos dos iogurtes. Este composto é produzido principalmente pelo *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus*, sendo a glucose o principal precursor, respondendo por mais de 90% do acetaldeído produzido, no entanto, o citrato e a L-treonina também são considerados relevantes na formação do acetaldeído, além de outros como o diacetil e o etanol (Ott et al. 2000).

Da análise dos resultados obtidos nas análises sensoriais efectuadas ao longo do tempo de vida do iogurte, é possível concluir que em termos sensoriais o produto mantém-se bastante estável até ao 32º dia de armazenamento e com um sabor bastante agradável, conforme constatado no **Gráfico 13**, no qual se reflete a aceitação por parte dos consumidores, quando estes comparam o produto em análise com o produto alvo.

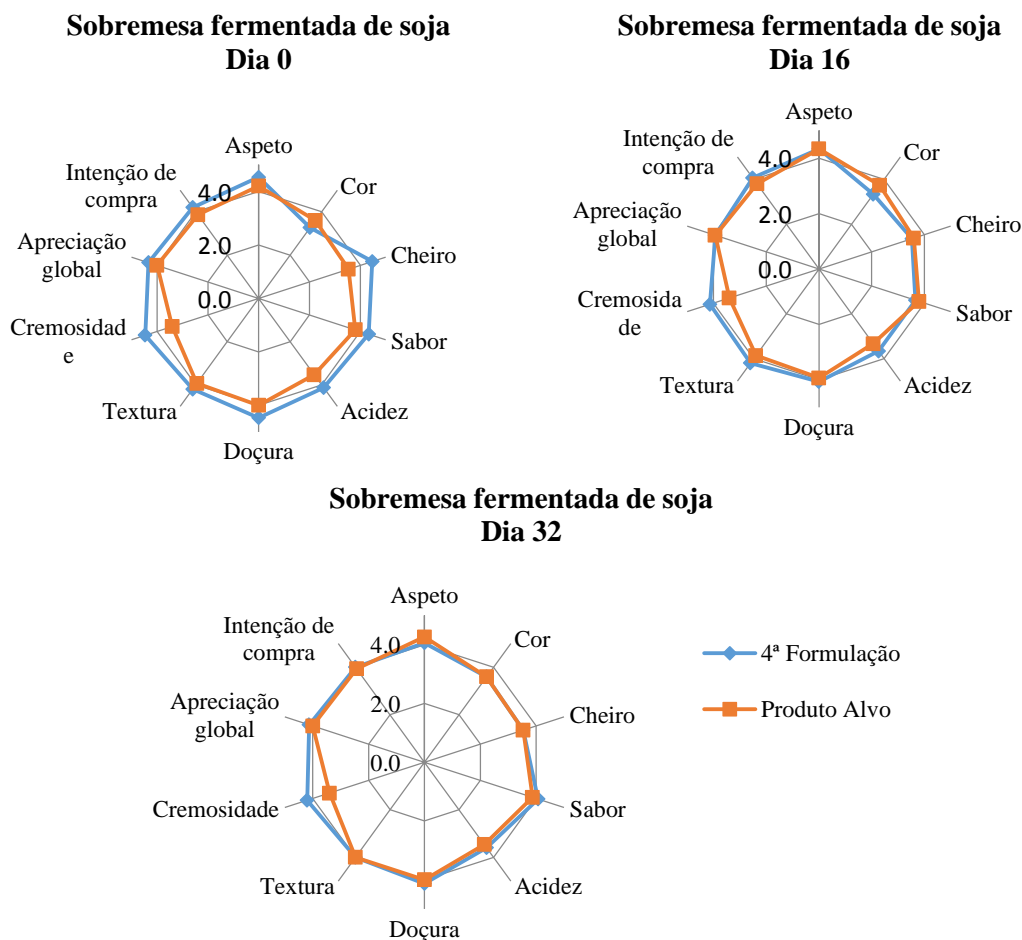


Gráfico 13 – Evolução da avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenamento

Inicialmente pretendia-se que o produto tivesse uma validade de 45 dias, contudo, uma vez atingida essa meta, aquando da abertura de várias embalagens verificou-se a existência de crescimento microbiológico, nomeadamente, bolores e leveduras. Assim sendo, consideramos o produto obtido deste desenvolvimento laboratorial como próprio para consumo até 32 dias de armazenamento (eventualmente futura validade do produto), que apesar de distante do valor pretendido aproxima-se já das validades atribuídas a produtos semelhantes presentes no mercado.

Podemos concluir que a cultura utilizada possui um bom equilíbrio entre *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, essencial para obtenção das características organolépticas típicas dos iogurtes, que acontece pelo facto do *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* ser capaz de hidrolisar a caseína em aminoácidos essenciais (valina, histidina e leucina) que por sua vez estimulam o crescimento do *Streptococcus thermophilus*, este consome o oxigénio remanescente produzindo ácido láctico e ácido fórmico, reduzindo o pH do meio a níveis óptimos de crescimento para o *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus*. O ácido láctico que resulta da fermentação contribui para a desestabilização das proteínas, provocando coagulação quando atingido o ponto isoelétrico (pH 4,6-4,7) e conduzindo à formação de um gel, o iogurte (Ott et al. 2000).

No final do ensaio laboratorial e após análise dos resultados obtidos ao confrontá-los com a legislação portuguesa aplicável à produção de iogurtes (Tabela 22), foi possível constatar que o produto desenvolvido reúne várias das características/exigências aplicáveis aos mesmos, o que poderá constituir um argumento bastante relevante no que respeita a marketing e comunicação, uma vez que podemos considerar que as sobremesas de soja poderão ser vistas como verdadeiras alternativas vegetais ao iogurte.

Tabela 22 – Adaptação do anexo referido no nº 9 da Portaria nº 742/92 de 24 de Julho

Iogurte	
Viabilidade de flora específica (segundo a NP – 698)	Germes da flora específica com viabilidade própria
Teor de flora específica em 1 cm ³ – mínimo	5x10 ⁷
Bolores em 1 cm ³ (segundo a NP-700) – máximo	10 20 (nos aromatizados)
Leveduras em 1 cm ³ (segundo a NP-700) – máximo	100 200 (nos aromatizados)
Acidez, expressa em cm ³ da solução normal, por 100g (segundo a NP-701) – mínimo	7
Matéria gorda (segundo a NP-702)	<ul style="list-style-type: none"> a) Iogurte gordo – teor mínimo de matéria gorda, na parte láctea de 3,5% (m/m); b) Iogurte meio gordo – teor mínimo de matéria gorda, na parte láctea de 1,5% (m/m) e máximo de 1,6% (m/m); c) Iogurte magro - teor máximo de matéria gorda de 0,3% (m/m)
Resíduo seco isento de matéria-gorda (segundo a NP-703) – mínimo	8,5% (m/m)

10. Conclusão

Aquando da realização deste trabalho foi possível constatar que a tecnologia e desenho do processo produtivo instalados na empresa NUTRE – Industrias Alimentares, S.A. são bastante versáteis, permitindo o desenvolvimento de vários produtos de soja, tendo como base o extracto hidrossolúvel de soja. No âmbito deste trabalho foram desenvolvidas duas formulações de bebidas de soja, uma aromatizada e outra com adição de cacau, cumprindo-se assim o objectivo inicialmente traçado, uma vez que os produtos obtidos fazem já parte do portfólio de produtos da empresa e foram lançados no mercado. No decorrer do trabalho desenvolvido, algumas questões foram surgindo e seria oportuno, num trabalho futuro a análise de diferentes estabilizadores a utilizar em bebidas semelhantes às desenvolvidas, e a relação dos mesmos com o período de vida do produto.

.....

No que respeita à sobremesa fermentada de soja os ensaios laboratoriais permitiram concluir que a formulação selecionada, bem como o procedimento definido, permitiram obter um produto bastante aceite do ponto de vista organoléptico, e com um comportamento quer físico-químico quer microbiológico muito próximo do iogurte de leite.

Contudo, todos os resultados apresentados neste trabalho e obtidos experimentalmente devem ser revalidados para formulações testadas em linha. Também será importante estudar outras culturas na fermentação do extracto hidrossolúvel de soja e comparar com os resultados obtidos.

V. BIBLIOGRAFIA

- Allred, C. D. 2001. "Dietary Genistin Stimulates Growth of Estrogen-Dependent Breast Cancer Tumors Similar to That Observed with Genistein." *Carcinogenesis* 22(10): 1667–73.
- Asif, Mohammad. 2011. "Health Effects of Omega-3,6,9 Fatty Acids: Perilla Frutescens Is a Good Example of Plant Oils." *Oriental pharmacy and experimental medicine* 11(1): 51–59.
- Banerjee, Sanjeev, Yiwei Li, Zhiwei Wang, and Fazlul H Sarkar. 2008. "Multi-Targeted Therapy of Cancer by Genistein." *Cancer letters* 269(2): 226–42.
- Bashiti, Tarek A I El. 2010. "Production of Yogurt by Locally Isolated Starters: Streptococcus Thermophilus and Lactobacillus Bulgaricus." 10(ICBAS Special Issue): 56–58.
- Bedani, Raquel et al. 2014. "Tropical Fruit Pulps Decreased Probiotic Survival to In Vitro Gastrointestinal Stress in Synbiotic Soy Yoghurt with Okara during Storage." *LWT - Food Science and Technology* 55(2): 436–43.
- Bedani, Raquel, Elizeu Antonio, Susana Marta, and Isay Saad. 2013. "Impact of Inulin and Okara on Lactobacillus Acidophilus La-5 and Bi Fi Dobacterium Animalis Bb-12 Viability in a Fermented Soy Product and Probiotic Survival under in Vitro Simulated Gastrointestinal Conditions." *Food Microbiology* 34(2): 382–89.
- Bowles, Simone, and Ivo Mottin Demiate. 2006. "Caracterização Físico-Química de Okara e Aplicação em Pães do Tipo Francês." *Ciência Tecnologia Alimentar, Campinas, Brasil* 26(3): 652–659.
- Boye, Joyce, and Sabine Ribéreau. 1999. "Assessing Compositional Differences in Soy Products and Impacts on Health Claims." *Food Research and Development Centre Agriculture and Agri-Food Canada, Canada*: 453–470.
- Cederroth, C.R., and S. Nef. 2009. "Soy, Phytoestrogens and Metabolism: A Review." *Molecular and cellular endocrinology* 304(1-2): 30–42.
- Chen, Jun et al. 2013. "Determination of the Domain Structure of the 7S and 11S Globulins from Soy Proteins by XRD and FTIR." *Journal of the science of food and agriculture* 93(7): 1687–91.
- deMan, John M. 2013. Principles of Food Chemistry (3rd ed). *Springer Science & Business Media*, New York.
- Dixit, Ajay K et al. 2011. "12.Soybean Constituents and Their Functional Benefits." Research Signpost *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry* 661(2): 367–83.
- Dutra de Oliveira, J.E., Scatena Luiz, Norberto de Oliverira Netto, and Geraldo Garcia Duarte. 1966. "The Nutritive Value of Soya Milk and Cow's Milk in Malnourished Children: A Comparative Study." *The Journal of Pediatrics* 69(4): 670–75.

- Dziezak, J.D. 1991. "A Focus on Gums." *Food Technology*: 45(3), 116–32.
- Fennema, O.R. 1996. "Food Chemistry." *MARCEL DEKKER, INC.*
- García, M.C. et al. 1997. "Composition and Characterization of Soyabean and Related Products." *Critical reviews in food science and nutrition* 37(4): 361–91.
- García, Mconcepción, Mluisa Marina, Fernando Laborda, and Mercedes Torre. 1998. "Chemical Characterization of Commercial Soybean Products." *Food Chemistry* 62(3): 325–31.
- Golbitz, P. 1995. "Traditional Soyfoods: Processing and Products." *The Journal of Nutrition* 125(3 Suppl): 570S – 572S.
- Guimarães, Daniela Helena Pelegrine, and Amanda Ribeiro Calado. 2014. "Viabilidade Da Utilização Da Polpa de Abacate, Acrescida Do Extrato de Soja, Na Elaboração de Iogurte: Análises Reológicas E Sensorial." *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*: 5(3): 16–25.
- Guo, Mingro. 2013. "Functional Foods: Principles and Technology." *Elsevier Science*.
- Hackler, L. R. et al. 1965. "Effect of Heat Treatment on Nutritive Value of Soymilk Protein Fed to Weanling Rats." *Journal of Food Science* 30(4): 723–28.
- Haque, A., R.K. Richardson, and E.R. Morris. 2001. "Effect of Fermentation Temperature on the Rheology of Set and Stirred Yogurt." *Food Hydrocolloids* 15(4-6): 593–602.
- He, Fen-Jin, and Jin-Qiang Chen. 2013. "Consumption of Soybean, Soy Foods, Soy Isoflavones and Breast Cancer Incidence: Differences between Chinese Women and Women in Western Countries and Possible Mechanisms." *Food Science and Human Wellness* 2(3-4): 146–61.
- Herve-Jimenez, Luciana et al. 2009. "Postgenomic Analysis of Streptococcus Thermophilus Cocultivated in Milk with Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus: Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism." *Applied and Environmental Microbiology* 75(7): 2062–73.
- Imram, Nazlin, Irene Gomez, Vincent Soh, and Et Al. 2003. "Soya Handbook." ed. *Ph.D Nazlin Imram, M.Sc.* Singapore: Tetra Pak Centre of Expertise Soya.
- Instituto Português da Qualidade, IPQ. 1996. "NP EN 1132 (1996) - Norma Portuguesa: Sumos de Frutos E de Produtos Hortícolas: Determinação Do Valor Do pH." *Instituto Português da Qualidade, 1997*: 9p.
- International Organization for Standardization (ISO). 2009. "ISO 659:2009 - Oilseeds -- Determination of Oil Content (Reference Method)."
- Jankowska, Agnieszka, Aleksandra Grześkiewicz, Krystyna Wiśniewska, and Arnold Repts. 2012. "Examining the Possibilities of Applying High Pressure to Preserve

- Yoghurt Supplemented with Probiotic Bacteria.” *High Pressure Research* 32(3): 339–46.
- Jooyandeh, H. 2011. “Soy Products as Healthy and Functional Foods.” *Middle-East Journal of Scientific Research* 7(1): 71–80.
- Jung, Stephanie, Patricia A. Murphy, Ileana Sala, and Et Al. 2008. “Isoflavone Profiles of Soymilk as Affected by High-Pressure Treatments of Soymilk and Soybeans.” *Food Chemistry* 111(3): 592–98.
- Kempka, Aniela Pinto et al. 2008. “Formulação de Bebida Láctea Fermentada Sabor Pêssego Utilizando Substratos Alternativos E Cultura Probiótica Formulation of a Peach-Flavored Dairy Drink Using Alternative Substrates and Probiotic Culture.” *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*.28: 170–77.
- Kinsella, J.E. 1979. “Functional Properties of Soy Proteins.” *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 56(3): 242–58.
- Koshiyama, Ikunori. 1983. “Seed Proteins.” eds. *Werner Gottschalk and Hermann P. Müller. Dordrecht: Springer Netherlands.*
- Kwok, Kin-Chor, Han-Hua Liang, Keshavan Niranjana, and Et Al. 2002. “Optimizing Conditions for Thermal Processes of Soy Milk.” *Journal of agricultural and food chemistry* 50(17): 4834–38.
- Lawless, Harry T., and Hildegard Heymann. 2010. “Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices - 2nd Edition.” *Food Science and Nutrition.*
- Liu, K. 1997. “Soybeans Chemistry Technology and Utilization.” *New York: Chapman & Hall*: 532p.
- Ma, Lei et al. 2014. “Evaluation of the Chemical Quality Traits of Soybean Seeds, as Related to Sensory Attributes of Soymilk.” *Food chemistry* 173: 694–701..
- MacLeod, G, and J Ames. 1988. “Soy Flavor and Its Improvement.” *Critical reviews in food science and nutrition* 27(4): 219–400.
- Martin, Adriana Furlan. 2002. “Effect of the period of storage on the proportion of lactic bacteria in commercial yogurt.” Universidade de São Paulo, Brasil.
- Mateos-Aparicio, I, A Redondo Cuenca, M J Villanueva-Suárez, and M A Zapata-Revilla. 2008. “Soybean, a Promising Health Source.” *Nutrición hospitalaria* 23(4): 305–12.
- Mateos-Aparicio, I, A. Redondo-Cuenca, M.J. Villanueva-Suárez, and Et Al. 2010. “Isolation and Characterisation of Cell Wall Polysaccharides from Legume by-Products: Okara (soymilk Residue), Pea Pod and Broad Bean Pod.” *Food Chemistry* 122(1): 339–45.

- Messina, Mark J. 1999. "Legumes and Soybeans : Overview of Their Nutritional Profiles and Health Effects" *The American Journal of Clinical Nutrition*;70(supl):439S–50S.
- Min, Xiaoyu. 2008. "Seed Chemical Composition Change During Development and Post-Harvest Processing of Vegetable Soybean. " University of Arkansas *Ann Arbor ProQuest*: 59
- Ministério, Agricultura E Do Comércio E Turismo. 1992. "Diário Da República - I Série B nº169 Portaria Nº 742/92 de 24 de Julho." : 3462–65.
- Mital, B. K., K. H. Steinkraus, and H. B. Naylor. 1974. "Growth of Lactic Acid Bacteria in Soy Milks." *Journal of Food Science* 39(5): 1018–22.
- Mujoo, R., D.T. Trinh, P.K.W. Ng, and Et Al. 2003. "Characterization of Storage Proteins in Different Soybean Varieties and Their Relationship to Tofu Yield and Texture." *Food Chemistry* 82(2): 265–73.
- Murray, J.M, C.M Delahunty, and I.A Baxter. 2001. "Descriptive Sensory Analysis: Past, Present and Future." *Food Research International* 34(6): 461–71.
- Natarajan, Savithiry S. Chenping Xu, Hanhong Bae, Thomas J. Caperna, and W.M. et al. Garrett. 2006. "Characterization of Storage Proteins in Wild (Glycine Soja) and Cultivated (Glycine Max) Soybean Seeds Using Proteomic Analysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(8):3114-3120
- Nieuwenhuyzen, W.V. 1976. "Lecithin Production and Properties." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 53(6): 425–27.
- Olsen, Robert L. 1989. "Effects of Polysaccharides on Rennet Coagulation of Skim Milk Proteins." *Journal of Dairy Science* 72(7): 1695–1700.
- Ott, Andreas, Alain Hugi, Marcel Baumgartner, and Alain Chaintreau. 2000. "Sensory Investigation of Yogurt Flavor Perception: Mutual Influence of Volatiles and Acidity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2): 441–50.
- Patisaul, Heather B, and Wendy Jefferson. 2010. "The Pros and Cons of Phytoestrogens." *Frontiers in Neuroendocrinology* 31(4): 400–419.
- Pinto, S. M. 2001. "Estudo Do Acetaldeído, Diacetil E Etanol Em Leites Fermentados." *Doutorado em Ciência dos Alimentos*.
- Prabhakaran, Molamma P., and Conrad O. Perera. 2006. "Effect of Extraction Methods and UHT Treatment Conditions on the Level of Isoflavones during Soymilk Manufacture." *Food Chemistry* 99(2): 231–37.
- Prakash, Dhan, and Girish Sharma. 2014. "Phytochemicals of Nutraceutical Importance. " *Journal of Chinese Medicine Research and Development (JCMRD)* 1(3): 70–78.

- Redondo-Cuenca, Araceli, M José Villanueva-Suárez, Inmaculada Mateos-Aparicio, and Et Al. 2008. "Soybean Seeds and Its by-Product Okara as Sources of Dietary Fibre. Measurement by AOAC and Englyst Methods." *Food Chemistry* 108(3): 1099–1105.
- Renkema, J.M.S. 2001. "Formation , Structure and Rheological Properties of Soy Protein Gels." *PhD thesis, Wageningen Universiteit*. The Netherlands.
- Rivera-Espinoza, Yadira;, and Yoja; Gallardo-Navarro. 2010. "Non-Dairy Probiotic Products." *Food microbiology* 27(1): 1–11.
- Rohm, H., and Alesa Kovac. 1994. "Effects of Starter Cultures on Linear Viscoelastic and Physical Properties of Yogurt Gels." *Journal of Texture Studies* 25(3): 311–29.
- Rupérez, I. Espinosa-Martos y P. 2006. "Soybean Oligosaccharides. Potential as New Ingredients in Functional Food." *Nutrición Hospitalaria* 21(1):92-96.
- Singh, Preeti, R. Kumar, S. N. Sabapathy, and A. S. Bawa. 2008. "Functional and Edible Uses of Soy Protein Products." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7(1): 14–28.
- Sin-Huei Wang, Cláudia S. Marinho, and Eliana P. Carvalho. 1994. "Produção de Iogurte de Soja com Diferentes Associações de Bactérias Láticas." *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 29(10): 1593–1601.
- Souza, G. 1991. "Fatores de Qualidade Do Iogurte." *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*: 20(1): 20–27.
- Toole, Desmond K O. 1999. "Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production S A Review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 363-371.
- Umbelino, Daniela Cardoso, Elizeu Antonio Rossi, Helena Maria André Bolini Cardello, and José Salvador Lepera. 2001. "Aspectos Tecnológicos e Sensoriais do "Iogurte" de Soja Enriquecido com Cálcio." *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21(3): 276–80.
- Van der Ven, Cornelly, Ariette M Matser, Robert W van den Berg, and Et Al. 2005. "Inactivation of Soybean Trypsin Inhibitors and Lipoxygenase by High-Pressure Processing." *Journal of agricultural and food chemistry* 53(4): 1087–92.
- Vlahopoulou, Ioanna, and A E Bell. 1993. "Effect of Various Starter Cultures on the Viscoelastic Properties of Bovine and Caprine Yogurt Gels." *International Journal of Dairy Technology* 46(2): 61–63.
- Wolf, Walter J., and Terry C. Nelsen. 1996. "Partial Purification and Characterization of the 15S Globulin of Soybeans, a Dimer of Glycinin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(3): 785–91.

-
- Yuan, Shaohong, Sam K C Chang, Zhisheng Liu, and Baojun Xu. 2008. "Elimination of Trypsin Inhibitor Activity and Beany Flavor in Soy Milk by Consecutive Blanching and Ultrahigh-Temperature (UHT) Processing." *Journal of agricultural and food chemistry* 56(17): 7957–63.
- Zhao, E, and Qing Mu. 2011. "Phytoestrogen Biological Actions on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth." *Scientia pharmaceutica* 79(1): 1–20.
- Zourari, A., J. P. Accolas, and M. J. Desmazeaud. 1992. "Metabolism and Biochemical Characteristics of Yogurt Bacteria. A Review." *Le Lait* 72(1): 1–34.

VI. ANEXOS

Anexo 1 – Okara

A *Okara* é uma fonte importante de nutrientes que não são extraídos ou que são pouco hidrossolúveis. Trata-se de um alimento complexo, rico em proteínas, vitaminas e em sais minerais de fácil digestão e muito rica em fitoesteróis, daí a sua crescente procura (**Noguchi 1987**). É rica em fibra dietética, principalmente insolúvel, além de proteína e gordura (**van der Riet et al. 1989; O'Toole 1999**).

A fibra dietética solúvel apresenta um carácter potencial prebiótico e as fracções de fibra dietética são conhecidas por se comportarem de diferentes formas. Além disso, a fibra dietética solúvel desempenha um papel importante na redução de níveis de colesterol em alguns indivíduos com hiperlipidemia, e pode também ser usado para melhorar a tolerância à glicose em diabetes. Possui propriedades anti-inflamatórias e efeitos anticancerígenos no trato digestivo (**Roberfroid et al. 1993**).

Por outro lado, a fibra dietética insolúvel aumenta o volume fecal e reduz o tempo de trânsito intestinal. Parece ainda ter um efeito positivo em diarreia e obstipação bem como, no tratamento do síndrome do cólon irritável. A *Okara*, tal como a maioria dos resíduos vegetais da indústria alimentar, é muito rica em fibra insolúvel, mas tem um baixo conteúdo em fibra alimentar solúvel (**O'Toole 1999; Préstamo et al. 2007**).

A composição nutricional (**Tabela 13**) depende da quantidade de água presente no produto. Inicialmente apresenta grandes quantidades de água (aproximadamente 80%) (**Tadano et al. 1981**), mas quando seca, a quantidade de água diminui significativamente para aproximadamente 9% (**Matsumoto et al. 2007**).

Tabela 23 – Composição nutricional encontrada na *Okara*.

<i>Okara</i>	Sólidos totais (%)	Água (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Fibras (%)	Hidratos de carbono (%)	Minerais (mg/100g)	Energia (Kcal)	pH	Autor
Não seca	-	84,5	4,73	1,5	1,5	7	0,4	-	6,71	(Tadano, Yokoya et al. 1981)
Seca	-	8,9	24	15,2	42,8	-	4	338,8	-	(Matsumoto, Watanabe et al. 2007)
	93,5	-	41,3	0,9	-	46,2	5,04	-	-	(Vishwanathan, Govindaraju et al. 2011)

Alguns autores encontraram na *Okara* uma concentração de 35,7% de isoflavonas totais, tendo sido identificadas doze compostos diferentes (**Bowles and Demiate 2006**). Outros autores concluíram que aproximadamente um terço do conteúdo de isoflavonas presentes no grão de soja é transferido para a *Okara* (**Jackson et al. 2002**).

Desta forma, devido à elevada concentração proteica da *Okara*, muito semelhante ao dos grãos de soja, apresenta potencial para ser utilizado como fonte de nutrientes e de isoflavonas.

Composição em isoflavonas

O teor de isoflavonas presente na *Okara* encontra-se representado na **Tabela 14**, na qual se observa uma concentração de 35,7% de isoflavonas totais. A isoflavona genistina apresenta uma concentração superior comparativamente com as restantes isoflavonas determinadas (9,3 mg%) seguida de 6"-*O*-Acetil-genistina (8,19 mg%), 6"-*O*-Malonil-daidzina (7,2 mg%) e daidzina (5,4 mg%) (**Bowles and Demiate 2006**).

A soja utilizada como matéria-prima na obtenção da *Okara* analisada neste estudo apresenta aproximadamente 108 mg% de isoflavonas totais. A concentração de

isoflavonas na soja pode apresentar variações muito expressivas dependendo das variedades de soja que influenciam as concentrações de isoflavonas de 141,0 mg% a 389 mg% (Jackson et al. 2002).

Tabela 24 – Teor de isoflavonas da *Okara* (Bowles and Demiate 2006)

Isoflavona	Média mg%	C.V. %
Daidzina	5,40	5,28
Glicitina	1,02	12,75
Genistina	9,30	4,46
6''-O-Malonil-dadzina	7,23	0,83
6''-O-Malonil-glicitina	0,65	7,69
6''-O-Malonil-denistina	0,26	2,25
6''-O-Acetil-dadzina	0,34	1,71
6''-O-Acetil-glicitina	0,31	0
6''-O-Acetil-genistina	8,19	4,03
Daidzeína	1,61	1,86
Gliciteína	0,13	0
Genisteína	1,46	2,05
Total	35,73	3,85

Caracterização microbiológica

As análises microbiológicas realizadas na farinha preparada a partir do subproduto *Okara* apresentaram resultados satisfatórios. A quantificação de coliformes totais apresentou valores inferiores a 10,0 UFC/g, enquanto o despiste da *Salmonella sp.* determinou ausência deste microrganismo nas condições teste. Estes resultados são fundamentados com base no padrão microbiológico indicado para a determinação de coliformes, segundo a RDC 12/2001-MS, em que o limite máximo é 102 UFC/g. No caso da determinação de *Salmonella sp.*, é exigido a ausência do patogénico na amostra (Bowles and Demiate 2006).

Factor anti-nutricional

Na *Okara* existem alguns componentes que têm efeitos anti-nutricionais ou adversos para a saúde, principalmente quando consumidos em grandes quantidades, nomeadamente o ácido fítico (hexafosfato de inositol), cuja função fisiológica nas plantas é geralmente atribuída a reserva de fósforo para a germinação. No caso dos

.....

alimentos e da *Okara*, é de referir o efeito na bioviabilidade de minerais e na solubilidade de proteínas. A habilidade do ácido fítico em quelar iões metálicos di e tri valentes, tais como Ca, Mg, Zn e Fe, possibilita a formação de compostos não muito solúveis, que não são totalmente absorvidos pelo intestino (**Liu 1997**).

Anexo 2 - Outros derivados da soja

Óleo de soja

Trata-se de um dos mais importantes óleos vegetais em todo o mundo, representando em 2012/2013 cerca de 27% da produção de óleos vegetais. A indústria do biodiesel aumentou ainda mais a procura pelo óleo de soja (**He and Chen 2013**).

Lecitina de soja

A lecitina de soja é um importante emulsionante natural usado nas indústrias, alimentar, de rações animais, farmacêutica e indústrias técnicas. Tecnicamente as lecitinas podem ter diversas proveniências, tais como, gema de ovo, várias sementes, nomeadamente, sementes de algodão, sementes de linho, gérmen de milho, sementes de girassol, sementes de colza e sementes de soja.

A lecitina é obtida a partir do óleo de soja, em quatro passos: hidratação dos fosfatídeos, separação de lamas, secagem e arrefecimento e é usada principalmente pela sua grande disponibilidade e excelentes propriedades como emulsionante, pela cor e sabor (**Nieuwenhuyzen 1976**). Na **Tabela 25** é possível ver a composição típica da lecitina de soja.

Tabela 25 – Composição típica (%) da lecitina de soja (**Nieuwenhuyzen 1976**)

Fosfatidilcolina	20%
Fosfatidiletanolamina (cefalina)	15%
Fosfatidilinositol	20%
Ácidos fosfatídicos, outros fosfatídeos	5%
Hidratos de carbono, esteróis	5%
Triglicéridos	35%

Farelo de soja (*Meal*)

Consiste na parte sólida da soja (*cake*) que resulta da extracção do óleo. O teor de proteína elevado (> 40%) faz com que seja uma fonte de proteína importante para a indústria das rações animais (**He and Chen 2013**).

Farinha e *grits* de soja

A indústria alimentar tem vindo a utilizar cada vez mais as diferentes formas de proteína de soja como matéria-prima, classificando-a em três grandes grupos com base no teor de proteína, como mostrado na **Tabela 26 (Golbitz 1995)**.

Tabela 26 - Composição centesimal de formas comerciais de proteínas de soja (**Singh et al. 2008**)

Forma	Proteína (%)	Lípidos (%)	Humidade (%)
Farinha e <i>grits</i>			
Completa	41,0	20,5	----
Alto teor de gordura	46,0	14,5	6,0
Baixo teor de gordura	52,5	4,0	6,0
Desengordurada	53,0	0,6	6,0
Com lecitina	51,0	6,5	7,0
Concentrado	66,2	0,3	6,7
Isolado	92,8	<0,1	4,7
Proteína de soja texturizada	50,0	6 a 8	9,0

As formas menos refinadas de proteínas de soja são a farinha e *grits*, que têm diferentes teores de gordura, tamanhos de partículas, texturas e graus de tratamento térmico.

As farinhas são preparadas por moagem de flocos de soja até uma granulometria de cerca de 100mesh (tamanho de poro de 0,157mm-peneira) ou mais fino, enquanto os *grits* são mais grosseiros do que 100 mesh. O conteúdo proteico mínimo destes materiais varia de 40% a 54% dependendo do teor de gordura (**Singh et al. 2008**). As proteínas, os hidratos de carbono e as cinzas são os principais constituintes da farinha desengordurada, os restantes constituintes são lípidos residuais e outros componentes minoritários, tais como, isoflavonas e saponinas. Cerca de metade dos hidratos de carbono que constituem a farinha são oligossacáridos (sacarose, estaquiose, e rafinose),

enquanto a outra metade é constituída por polissacarídeos, que são insolúveis em água ou álcoois (**Singh et al. 2008**).

Concentrados

Os concentrados de proteína de soja são produtos mais refinados do que a farinha e *grits* e contêm 70% ou mais de proteína em base seca. São preparados a partir de flocos de farinha desengordurada, ou farinha desengordurada após remoção dos oligossacarídeos, parte das cinzas, e alguns dos componentes minoritários através de 3 métodos distintos.

O 1º método envolve a lavagem dos flocos sem gordura ou farinha com 60% a 80% de álcool aquoso. As proteínas e polissacarídeos são insolúveis em álcool, enquanto os açúcares e outros compostos se dissolvem e são removidos. O concentrado é, em seguida, seco a pH neutro.

O segundo procedimento utiliza uma lixiviação ácida a cerca de pH 4,5 para remover os açúcares. A este pH, as principais globulinas encontram-se no seu ponto isoelétrico, ou seja, quer as proteínas quer os polissacarídeos são insolúveis sob estas condições. O concentrado de proteínas é então neutralizado e seco.

O terceiro procedimento usa o calor húmido para desnaturar e insolubilizar as proteínas nos flocos ou farinha seguido por uma lavagem com água para remover os açúcares e outros componentes minoritários (**Singh et al. 2008**).

Embora os concentrados preparados por qualquer um destes métodos contenham 70% ou mais de proteínas, as suas propriedades físicas serão diferentes dependendo do método de preparação. Os concentrados têm menos sabor, quando comparados com farinhas e grãos, porque o processo de concentração remove alguns dos constituintes minoritários que são responsáveis pelo sabor característico da soja (**Singh et al. 2008**).

Isolados

Os isolados são as formas mais refinadas de proteínas de soja e contêm 90% ou mais de proteína. São preparados por remoção dos polissacarídeos insolúveis em água, bem como, os oligossacarídeos e outros componentes de baixo peso molecular.

Os flocos ou a farinha desengordurada, que são inicialmente sofrem um tratamento térmico suave, são submetidas ao processo de extracção com água em meio alcalino pH de 7 a 8,5, ocorrendo então separação dos polissacarídeos insolúveis em água e a proteína residual. Nas etapas subsequentes, o extracto clarificado contendo a maior parte das proteínas, além dos açúcares é ajustado para cerca de pH 4,5. Este tratamento provoca a precipitação das proteínas, que são então removidas por centrifugação ou filtração.

Os isolados podem conter mais do que 95% de proteína, mas contêm também de 2% a 5% cinzas e 3% a 4% de componentes minoritários.

Os concentrados de soja e isolados são excelentes fontes de proteína, apresentam alto teor de lisina, sabor suave, reduzido teor de açúcares redutores e redução dos factores que contribuem para flatulência (**Singh et al. 2008**).

Os isolados de proteína de soja são largamente utilizados na indústria alimentar, em preparados proteicos, alimentação infantil, sopas, substitutos de refeição, bebidas de soja, sobremesas congeladas, molhos, produtos de padaria e pastelaria, cereais de pequeno-almoço, alimentação animal, *pasta*, queijos alternativos, *snacks* e suplementos proteicos (**He and Chen 2013**).

Proteínas de soja texturizadas

Os termos " proteína de soja texturizada" ou "TSP" estão associados a farinha de soja desengordurada ou concentrados, que processados mecanicamente com recurso a extrusoras, permitem obter produtos semelhantes à carne, em termos de textura quando rehidratados e cozidos.

Os flocos e *grits* de soja juntamente com proteína de soja também são utilizados de forma inovadora para adicionar textura aos produtos alimentares. Os benefícios adicionais de extrusão ou cozimento são a desnaturação das proteínas, a inactivação dos inibidores da tripsina, controlo de sabores amargos e a homogeneização de ingredientes que podem incluir corantes, químicos e outros aditivos (**Singh et al. 2008**).

Carne análoga

Com a evolução tecnológica, a proteína de soja por si só ou combinada com outras proteínas vegetais, pode ser processada em vários produtos texturizados. Estes produtos são considerados substitutos de carne, sendo comumente chamados de “carne

análoga”. Quer na forma de congelados, refrigerados ou desidratados apresentam cor semelhante à carne correspondente. Podem encontrar-se na forma de ingrediente simples, ou na forma de produto formulado tal como almondegas e salsichas vegetarianas, melhorando substancialmente a aparência destes produtos. Estes produtos permitem expandir as escolhas proteicas para os vegetarianos e consumidores de alimentação saudável (**He and Chen 2013**).

Produtos tradicionais

Natto

É um produto tradicional Japonês obtido por fermentação de grãos de soja pela cultura *Bacillus subtilis natto*. À semelhança do que acontece com queijos fortes, o cheiro, sabor e textura viscosa do *Natto* representam um desafio em termos de aceitação por parte dos consumidores. Tornou-se mais popular nos últimos anos, muito pelo facto dos consumidores americanos perceberem os seus benefícios de saúde (**He and Chen 2013**).

Tempeh

É um produto fermentado de soja, originário da Indonésia e único em termos de textura, sabor e versatilidade (**Golbitz 1995**). O grão de soja descascado e parcialmente cozido é fermentado pelo fungo *Rhizopus oligosporus*. A extensa rede formada pela massa micelial e a soja origina um bloco semelhante a um naco de soja fermentado. Para além de ser um alimento com alto teor de proteína, a co-fermentação por algumas bactérias permite também a produção de vitamina B12, uma vitamina essencial. A dieta vegetariana pura é tipicamente deficiente nessa vitamina (**He and Chen 2013**).

Embora não tão popular como o *tofu*, a sua textura macia e sabor distinto permitem que seja facilmente utilizado como uma alternativa à carne, como resultado, uma grande variedade de “carnes análogas” produzidas com base no *tempeh* estão disponíveis no mercado (**Golbitz 1995**).

Miso

O *Miso* é um produto japonês que consiste numa pasta fermentada que pode ter cor branca, castanha ou castanho-avermelhado (**Golbitz 1995**). Esta pasta é utilizada como base da tradicional sopa de *Miso* e como ingrediente aromático usada em vários países orientais, nomeadamente, Japão, Coreia, Taiwan, Indonésia e China.

O processo de produção do *Miso* inicia-se com os grãos de soja previamente demolhados e cozidos até estarem macios, os grãos cozidos são depois aspergidos com o fungo *Aspergillus Oryzae* e moldado em pepitas koji, pode combinar-se com arroz ou cevada. Estas pepitas são incubadas durante o tempo necessário para que o fungo provoque a maturação dos grãos de soja tornando-os brancos e felpudos. As enzimas e nutrientes produzidos nesta etapa do processo são essenciais para as fermentações seguintes. As pepitas maturadas são misturadas com sal e água e fermentadas, resultando numa pasta, é durante a maturação que a pasta adquire sabor e aroma (**Golbitz 1995**).

Molho de soja

O molho de soja é um dos produtos mais consumidos na Ásia. Existem diferentes tipos de molho de soja, em que cada um tem as suas características e procedimentos específicos de manufactura (**Jooyandeh 2011**).

À semelhança do *Miso*, o processo tradicional de produção do molho de soja inicia-se com a fermentação de uma mistura de trigo e soja por diferentes microrganismos, nomeadamente, *Aspergillus*, bactérias lácticas e leveduras, criando um sabor e aroma complexos através de reacções químicas e bioquímicas que ocorrem durante o processo de manufactura (**He and Chen 2013**).

Anexo 3 - Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos

ETAPA		DESCRIÇÃO	
TRATAMENTO DO GRÃO	1.1	Recepção Soja	Abastecimento/aprovisionamento de matéria-prima
	1.2	Armazenamento de soja	Armazenamento temporário de soja para garantir <i>stock</i> de matéria-prima para produção
	1.3	Limpeza	Remoção de impurezas do grão de soja (corpos estranhos) e defeitos (verdes, partidos,...), por etapas:
			Separador de Limpeza: Separa corpos pesados de finos
			Separador de Pedras: Rejeita pedras
			Separador Óptico: Rejeita grão de soja classificado com defeito (verdes, negros, outros que não soja,...)
	1.4	Calibradora	De forma a homogeneizar o descasque do grão de soja, o grão é separado em dois calibres distintos através da calibradora.
	1.5	Armazenamento	Os calibres são armazenados em 2 depósitos intermédios (Depósito 5.6.5 e 6.5.8). De seguida são enviados para um depósito de alimentação ao descascador. Estes depósitos podem armazenar produto entre produções.
1.6	Íman magneto	Antes de entrada no descascador, o grão de soja passa num íman para remoção de partículas magnéticas.	
1.7	Descasque: Descascadora e Separador	Remoção da casca do grão de soja e separação do grão descascado.	
1.8	Detector Metais	Detecta metais, e rejeita produto potencialmente não seguro.	
EXTRAÇÃO DA BASE DE SOJA	2.1	Recepção de materiais auxiliares e Armazenamento	Recepção de materiais auxiliares em contacto com o produto, como Bicarbonato de sódio, peróxido de hidrogénio,...
			Armazenamento de materiais auxiliares em contacto com o produto, como Bicarbonato de sódio, peróxido de hidrogénio,...
	2.2	Preparação e armazenamento solução Bicarbonato	A solução de bicarbonato é efectuada manualmente, com a junção de bicarbonato de sódio manualmente e de forma automática, aquecido com vapor de água a 45°C. A solução pode ficar armazenada entre produções.
	2.3	Armazenamento temporário	Antes de entrada para a moagem, é efectuado um armazenamento temporário de grão de soja descascado. Todo o grão descascado é consumido até final da produção.
2.4	Moagem e extracção	Moagem do grão e extracção da proteína, com utilização de água e bicarbonato de sódio,	

		aquecido com vapor indirecto 80°C. Nesta etapa ocorre a desactivação da lipoxigenase.	
2.5	Decantador 1	<p>Separação de fases, sólida e líquida.</p> <p>A fase líquida consiste na parte útil para o produto. A fase sólida, vai ainda ser alvo de mais uma separação de forma a aumentar recuperação.</p>	
2.5	Decantador 2	<p>Segunda separação de fases, sólida e líquida, de forma a aumentar o rendimento de extracção de proteína.</p> <p>Na fase líquida é incorporada água no produto de forma a auxiliar a decantação. A fase sólida é um sub-produto: OKARA (pasta de soja).</p>	
2.6	Desactivação e Desodorização	Nesta etapa ocorre a inibição do inibidor de tripsina a 120°C e eliminação de odores sob pressão	
2.7	Arrefecimento	Nesta etapa ocorre a redução da temperatura da base de soja, para níveis que permitam a sua conservação segura, sem aumento da actividade microbiana, 5°C.	
2.8	Armazenamento da Base	Conservação segura da base de soja, a temperatura inferior ou igual a 5°C, para posterior processamento Existem dois tanques de armazenamento de base de soja com capacidade 50 000 L.	
2.9	Okara	A Okara (pasta de soja) resultante do processo de extracção é encaminhada para o exterior da unidade fabril, depositada em contentores e encaminhada para um gestor de resíduos.	
PREPARAÇÃO PRODUTO	3.1	Recepção de Ingredientes e Armazenamento	Abastecimento/aprovisionamento de ingredientes.
	3.2	Armazenamento de ingredientes	Armazenamento temporário para garantir stock de ingredientes para produção.
	3.3	Pesagem Manual de Ingredientes	Pesagem dos ingredientes de acordo com as receitas estabelecidas.
	3.4	Incorporação manual de ingredientes	Incorporação de Ingredientes de forma manual através do cone de recepção de ingredientes ou por mangueira, como por exemplo no caso dos concentrados.
	3.5	Pré-mistura	O equipamento permite a execução de uma pré-mistura de forma a facilitar a homogeneização de ingredientes na base de soja. Na pré-mistura pode ocorrer ainda, de acordo com a receita, o aquecimento da mistura até tempo pré-definido, por exemplo: a cozedura do chocolate.
	3.6	Mistura	Existem três tanques de mistura onde são efectuadas as misturas finais de acordo com a receita/formulação recirculando sempre que necessário (formulação) à pré-mistura. Os retrabalhos podem ser efectuados por nova incorporação de ingredientes no tanque da pré-mistura e nova recirculação.
	3.7	Armazenamento da mistura	A mistura após concluída poderá ser armazenada, a temperatura inferior ou igual a 5°C, num dos três tanques de mistura caso se verifique a necessidade de interromper a produção,

		durante um período máximo de 24h.
	3.8 Pasteurização (pelo UHT)	Tratamento térmico de forma a reduzir carga microbiana de partida, para a obtenção de uma fermentação controlada. Seguido à pasteurização é efectuado um arrefecimento. Os parâmetros pasteurização variam com a receita.
	3.9 Homogeneização	Homogeneização por pressão (50 / 200 bar) do produto após pasteurização, com vista a homogeneizar as gorduras.
	3.10 Armazenamento Asséptico	Armazenamento pulmão para alimentação às linhas de enchimento. Não é um passo obrigatório, podendo a bebida pasteurizada seguir directamente para o enchimento, como é o caso do enchimento com a TBA8.
EMBALAMENTO	4.1 Recepção de Material embalagem	Abastecimento/aprovisionamento de material de embalagem primária. Abastecimento/aprovisionamento de material de embalagem (secundária e terciária).
	4.2 Armazenamento de Material embalagem	Armazenamento temporário para garantir material de embalagem primária para produção. Armazenamento temporário para garantir material de embalagem (secundária e terciária) para produção.
	4.3 Enchimento Asséptico	Enchimento asséptico da bebida de soja, em embalagem Tetra Pak seguido de marcação de lote e validade Previamente ao enchimento considera-se uma desinfecção de material de embalagem primário com solução de peróxido. Existem duas máquinas de enchimento conforme capacidade da embalagem.
	4.5 Embalamento Secundário e Terciário	Formação de embalagens em grupo (caixa, pack retráctil, tabuleiro,...) e paletização. No caso de embalagem 200 mL, colocação de palha, antes de agrupar.
	4.6 Armazenamento Produto Acabado	No caso de embalagens de 1000 mL, colocação de recap antes de grupagem. Stock de produto acabado.
EXPEDIÇÃO	5.1 Carga e transporte	Fornecimento de produto final pode ser efectuado quer à porta da fábrica quer nas instalações de cliente, podendo para o efeito proceder-se: subcontratação de serviços de transporte.

ANEXO MANUAL HACCP PRÉ – REQUISITOS (PPR's)					
ORIGEM	PERIGO DE SEG. ALIMENTAR GERAL	BASE LEGAL	ANÁLISE DE PERIGOS		PPR
Recursos Humanos					
<p>Higiene Pessoal (vestuário, mãos, ferimentos,...)</p> <p>Objectos de uso pessoal (relógios, pulseiras, brincos, colares, ganchos, anéis, piercings,...)</p> <p>Alimentos, medicação e tabaco</p>	Objectos / partículas	F	Reg. 852/2004, Anexo II, Cap. VIII	<p>GERAL</p> <p>Embora sejam considerados especialmente relevantes pelo seu impacto no produto final, os postos de trabalho, mistura de ingredientes e enchimento asséptico, o facto de o próprio processo ser realizado em circuito fechado, com excepção da introdução de ingredientes, são definidas <u>regras transversais a todos os colaboradores de fabrico e visitantes</u>, independentemente da actividade e produto.</p> <p>"Todos os recursos humanos na área de produção podem constituir por si só um factor de risco associado a qualquer um dos perigos identificados (PSAG), tanto por desconhecimento como por hábitos e práticas incorrectas, razão pela qual é necessário estabelecer um conjunto de regras que condicionem o seu comportamento à realidade própria da unidade, como relativos a ferimentos, doença, alimentação, tabaco, medicação,...</p>	<p>Flyers visitas Manual Boas Práticas Formação e Sensibilização</p>
				<p>HIGIENE</p> <p>Pelas mesmas razões, existem na unidade de produção <u>pontos de higienização</u> estrategicamente localizados de modo a garantir simultaneamente o nível de higiene pessoal (mãos) requerido e a inexistência de focos de contaminação cruzada por esta via., com instruções de higienização específicas.</p>	
	Coliformes, E. coli, Staphylococcus aureus	M		<p>VESTUÁRIO</p> <p>À excepção do posto de trabalho de pré-mistura/mistura de ingredientes e enchimento, não existe possibilidade de contacto directo do operador com o produto ou com materiais em contacto directo com o produto (circuito fechado). Nesse sentido, e dadas as características intrínsecas do produto, a <u>higienização do vestuário de trabalho</u> não apresenta nenhum requisito específico, sendo suficiente ser mantido limpo. De igual modo, não são necessários requisitos particulares de <u>higienização de calçado</u> de</p>	<p>Flyers visitas Manual Boas Práticas Requisitos Elis</p>

				<p>trabalho, embora seja obrigatória a sua utilização. Contudo, a selecção do vestuário foi efectuada de modo cuidado de forma a não ser fonte de contaminação do produto final, nomeadamente inutilização de bolsos exteriores e sem botões, para os operadores da linha.</p> <p>Está definido que os trabalhadores devem vestir a farda nas instalações da Nutre. Sempre que se desloquem ao exterior, os colaboradores devem retirar a farda. Todos os colaboradores que possuam bata, devem retirá-la durante as pausas e fora da unidade industrial.</p>	
Contaminantes químicos (Pb, Hg,...)	Q		<p>VESTUÁRIO DESCARTÁVEL</p> <p>Sempre que pessoas externas ou visitas acedam à unidade fabril, é-lhes atribuído vestuário adequado, descartável, de forma a não introduzir risco de contaminação do produto com partículas,, alérgenos ou outro. É obrigatória a utilização de touca, bata plástica descartável ou outra disponível e protectores de pés. Sempre que a utilização do vestuário descartável possa colocar em causa a segurança da pessoa pelas actividades a desempenhar e desde que não exista o perigo de contaminação do produto, podem ser dispensados alguns dos equipamentos.</p>	Regulamento Visitas Flyer visitas	
			<p>OBJECTOS PESSOAIS</p> <p>Considerando como foco de contaminação possível o uso de qualquer <u>anel ou adornos pessoais</u>, a sua utilização não é permitida, com excepção, por motivos sociais/culturais, de aliança lisa e sem inserção de qualquer material, desde que utilizadas luvas em locais de contacto directo com produto (pré-mistura/mistura e embalagem asséptico).</p> <p>Não é permitido no interior da unidade fabril a utilização de <u>folhas com clips ou agramos</u>, muito embora o processo seja em circuito fechado e desenhado de forma a eliminar o risco de ocorrência do perigo no produto final.</p>	Formação e Sensibilização Flyers visitas Manual Boas Práticas	
Alérgenos (Glúten, amendoim, lactose, ...)	N		<p>ALIMENTOS</p> <p>Não é permitido o transporte para o interior das instalações fabris de qualquer alimento particulatr, sendo apenas permitido o consumo de água, fornecido pela empresa em copos descartáveis. Ao alimentos dos colaboradores, tal como outros objectos pessoas, devem ser colocados separadamente do vestuário.</p>	Formação e Sensibilização Manual Boas Práticas	
Instalações e Equipamentos					

Peças Material/composição dos equipamentos Lubrificantes Layout Exterior	Objectos/partículas	F	Reg.852/ 2004, Anexo II, Cap. I, II, V, VI	CIRCUITO	A <u>movimentação de produtos</u> pode ser um foco de contaminação cruzada, tendo sido por isso desenhado um circuito de produção marcha em frente, com excepção do abastecimento de matérias-primas (excepto soja) e subsidiárias, que é efectuada através do corredor técnico, a partir do armazém de produto acabado e material de embalagem. Contudo, neste caso, não existe qualquer risco de contaminação na medida em que tanto produto como matérias-primas, e material de embalagem se encontram devidamente protegidos.	Circuitos de movimentação
				VESTUÁRIOS	Os <u>vestiários</u> estão localizados fora da zona de produção, mas com acesso directo à mesma e fechado, de modo a proporcionar assim movimentação facilitada dos colaboradores devidamente equipados e simultaneamente uma barreira contra contaminações cruzadas. Os <u>sanitários</u> localizados na zona de produção, possuem antecâmara, e acesso ao corredor técnico, não constituindo acesso directo à produção.	Circuitos de pessoas
	Bolores e Leveduras, Carga microbiana excessiva, Coliformes, E. coli, Staphylococcus aureus	M		LAYOUT	Os <u>portões de entrada e saída</u> de mercadorias apenas são abertos no momento de recepção ou expedição, de modo a minimizar o risco de contaminação para a restante unidade de produção. As portas de acesso ao exterior encontram-se seladas, e não são utilizadas exceto em caso de urgência ou necessidade de acesso às utilidades	Instruções de trabalho Circuitos de movimentação
				ARMAZÉM	O armazenamento de <u>matérias-primas, subsidiárias e produto acabado</u> , é efectuada no interior das instalações, em local próprio, à excepção das paletes de madeira que podem ser armazenadas em local coberto e sem contacto directo com o solo (terra). As paletes de madeira são inspeccionadas antes da utilização no embalamento, sendo apenas utilizadas as que se apresentem em bom estado de conservação. As embalagens uma vez abertas, se não consumidas na totalidade são novamente fechadas, para armazenamento temporário de forma a não colocar em causa a conformidade/segurança alimentar do produto. Por outro lado, o <u>armazenamento de matérias-primas dos cereais estão compartimentadas</u> ,	Circuitos de movimentação

				fisicamente separadas dos ingredientes de soja.	
Contaminantes químicos	Q		ENVOLVENTE	A unidade de produção encontra-se <u>localizada em zona industrial</u> , cujas indústrias na envolvente não representam risco de contaminação para a actividade, nomeadamente para o produto. A Envolvente é mantida limpa e em bom estado de conservação, de forma a minimizar a presença de pragas	Plano de Manutenção
			MANUTENÇÃO E LIMPEZA INSTALAÇÕES	Como já mencionado trata-se de um processo maioritariamente em circuito fechado, razão pela qual o risco de contaminação por corpos estranhos associados a instalações (ex. vidro portas e janelas) e equipamentos (ex. peças metálicas), é mínimo e circunscrito à pré-mistura de ingredientes. o próprio processo está salvaguardado com a existência de filtros distribuídos ao longo do circuito, de modo a prevenir a contaminação de produto final conjuntamente com a manutenção e higienização programadas.	Plano de Manutenção
Alergénios (Glúten, amendoim, lactose, ...)	N		LIMPEZA	Do ponto de vista da contaminação microbiológica e química, o risco associado a instalações e equipamentos, existindo com as limitações próprias de um processo em circuito fechado é minimizado com um nível de higienização adequado, através <u>CIP</u> a partir do processamento do grão. Sendo a etapa tratamento UHT determinante para o nível de carga microbiana do produto final, a linha de produção sofre desinfecção com vapor a partir dessa operação. Do ponto de vista químico, as características dos produtos e equipamentos utilizados garantem a não contaminação do produto final.	Planos de Limpeza
			UTENSÍLIOS	Relativamente à contaminação accidental com alérgenos, a definição de linhas de produção fisicamente distintas entre as bebidas de soja e produtos de cereais, e, conforme já referido anteriormente, o facto da linha de bebidas de soja ser circuito maioritariamente fechado, são desde logo uma garantia de impossibilidade de contaminação accidental, mesmo que vestigial. Por outro lado, a definição de <u>utensílios distintos</u> para a formulação na linha de soja e na linha de cereais, permite eliminar o risco de contaminação cruzada assim como a higienização da linha sempre que a mudança de produto	Planos de Limpeza

					<p>possa conferir contaminação, nomeadamente sensorial entre produtos.</p> <p>Os utensílios são em material adequado ao contacto alimentar e verificados antes de utilização e durante a limpeza, de forma a não constituírem fonte de contaminação física ou química.</p>	
Utilidades						
Ar Comprimido	Objectos/partículas	F			<p>A única etapa onde existe contacto directo do ar com o produto é no armazenamento pós tratamento UHT. Trata-se de ar sanitário, proveniente de um compressor particular, isento de óleo mineral, com arrefecimento e desumidificação. Relativamente ao ambiente industrial, existe contacto directo do produto com o ar ambiente apenas no tratamento do grão e pré-mistura/mistura, sendo qualquer eventual contaminação, nomeadamente microbiológica, controlada posteriormente (Desactivação, Tratamento UHT).</p>	Plano de Manutenção
	Carga microbiana excessiva	M				
	Contaminantes químicos (óleo mineral)	Q				
Água de higienização Água de processo	Objectos/ partículas	F	Regulamento 852/2004, Anexo II, Cap. VII Decreto-Lei 306/2007		<p>Sendo a água utilizada desde logo na higienização, nomeadamente de recursos humanos, instalações e equipamentos, a sua qualidade para uso em indústria alimentar tem influência tanto na prevenção como na contaminação do produto final. A água utilizada na Nutre provem do <u>abastecimento público</u>, tratando-se de água própria para consumo.</p> <p>A água que entra no processo é alvo de um <u>tratamento</u> de forma a homogeneizar as suas características.</p>	Água da Rede Pública. Estação de Tratamento de água
	Coliformes, E.coli, carga microbiana excessiva	M				
	Contaminantes químicos (pH, ferro, ...)	Q				
Pragas						
Presença e/ou vestígios de roedores, insectos, ...	Insectos, ...	F	Regulamento 852/2004, Anexo II, Cap. IX		<p>As características das matérias-primas, nomeadamente soja e a sua proveniência (agricultura) bem como a área envolvente à unidade fabril, conferem algum risco de contaminação por pragas, nomeadamente roedores e insectos, que exigem por isso o seu controlo preventivo, pela colocação de <u>iscos</u>. Os <u>produtos utilizados</u> pela empresa de controlo de pragas são homologados pela Direcção Geral de Saúde.</p>	Controlo de pragas
	Contaminantes químicos	Q				
	Leptoespira, ...	M				
Produtos e utensílios de Higienização						

Concentração excessiva / uso indevido de soluções de higienização Material constituinte dos equipamentos/ utensílios de higienização	Contaminantes químicos	Q	Regulamento 852/2004,		O risco de produtos e utensílios de higienização decorre da possibilidade de não estar garantida a sua utilização na indústria alimentar, e da sua correcta utilização. A utilização indevida de <u>produtos de higienização</u> (não autorizados/concentração incorrecta) pode colocar em causa a segurança do produto, tanto directamente como indirectamente, razão pela qual só estão disponíveis produtos autorizados e o seu uso esteja definido em planos de higienização.	Formação Planos de Limpeza Aprovação Fornecedores e Materiais
	Objectos/ partículas	F	Anexo II, Cap. IX			
Materiais Embalagem e Químicos auxiliares						
Contaminação por transferência de partículas e/ou impróprio para industria alimentar	Contaminantes químicos	Q	Regulamento 852/2004, Anexo II, Cap. X		O risco de material de embalagem (<u>sem contacto directo</u>) decorre da possibilidade de não estar garantida a sua utilização na indústria alimentar não tendo contudo necessariamente características para contacto directo com alimentos. 'O risco de material de embalagem (<u>com contacto directo</u>) decorre da possibilidade de não estar garantida a sua utilização no contacto do produto em causa, nomeadamente no que diz respeito a migração de contaminantes para o produto. Dado o modo de fornecimento, bobine de filme, e embalagem do produto final, flowpak, não é expectável a contaminação do produto com contaminantes físicos. Os materiais de embalagem de contacto direto com a bebida apresentam um reduzido risco microbiológico (composição, baixo aw), sendo contudo relevante para as características do produto final (UHT). Por outro lado, po processo de enchimento considera uma desinfeccção da embalagem. Os quimicos auxiliares, que irão entrar em contacto com o produto alimentar, devem ser de categoria FOOD GRADE, para que não sejam fonte de contaminação química do produto.	Especificação de compra Recepção Técnica
	Objectos/ partículas	F	'Regulamento 1935/2004			
	Carga microbiana excessiva	M				
Transporte						
Contaminação de produto por contacto.	Contaminantes químicos	Q	Regulamento 852/2004,		O risco de contaminação durante o transporte depende do estado de acondicionamento dos produtos embalados. Tendo as condições de transporte influencia tanto a nivel de contaminação química (contacto), física, microbiologica e	Procedimento de compras - Produtos e serviços
	Objectos/ partículas	F	Anexo II, Cap. IV			
	Microbiologia	M				

	Alergénios (Glúten, amendoim, lactose, ...)	N		alergénios, razão pela qual são estabelecidas <u>especificações de compra particulares de serviços de transporte.</u>	(PP02-NTIA-POR)
--	---	---	--	---	-----------------

Legenda:**F** – Perigo Físico**Q** – Perigo Químico**M** – Perigo Microbiológico**N** – Perigo Nutricional

ANEXO MANUAL HACCP
AVALIAÇÃO DE MEDIDAS DE CONTROLO

PSAe	PSA Nº	Risco	Medida de controlo	Tipo P- prevençã o E – eliminaçã o R - redução	Q1 Nesta etapa existem medidas preventivas?	Q2 A medida é especifica para eliminar este perigo?	Q3 Pode ocorrer nesta etapa níveis inaceitaveis	Q4 Alguma medida de controlo posterior vai permitir controlar este perigo?	Tipo de Control o
Corpos estranhos (pedras, madeira, metais, plásticos, vidro,...)	F1	Baixo	Avaliação e qualificação de fornecedores	P	-	-	-	-	PrO
			Tratamento de grão (crivos, separação por gravidade, magnetos, leitor optico)	E	-	-	-	-	PrO
			Filtros de processo	E	-	-	-	-	PrO
Corpos estranhos: metais	F2	Baixo	Tratamento de grão (magnetos, detector metais)	E	-	-	-	-	PrO
Contaminantes (metais pesados, pesticidas, patulina, ocratoxina, Benzopireno,...) Inibidor da tripsina	Q1	Baixo	Avaliação e qualificação de fornecedores	P	-	-	-	-	PrO
	Q2	Baixo	Desactivação e Desodorização	E	-	-	-	-	PrO
Aditivos com limites máximos legais de incorporação	Q3	Baixo	Formulação de produto	P	-	-	-	-	PrO

Bolores, Carga microbiana variada e não específica, dependente do ingrediente, mas não identificado nenhum mencionado no Regulamento 2073/2004 e modificações	M1	Elevado	Avaliação e qualificação de fornecedores	P	1	Sim. A própria avaliação e qualificação de fornecedores.	0	Não. A avaliação de fornecedores é também efectuada por questões comerciais e de qualidade.	0	Não. O próprio processo está concebido de forma a reduzir a carga microbiana no produto final.	-	-	PrO		
			Desactivação e Desodorização	R	1	Sim. Avaliação e qualificação de fornecedores.	0	Não. A desactivação e desodorização são realizadas para desativar o inibidor da tripsina e para eliminar odores, respectivamente.	0	Não. Trata-se de uma operação em circuito contínuo e fechado, logo tempo de desenvolvimento microbiano excessivo.	-	-	PrO		
			Tempo e temperatura de armazenamento da base	P	1	Sim. Avaliação e qualificação de fornecedores e a própria medida de controlo é preventiva	0	Não. O armazenamento refrigerado é apenas preventivo.	1	Sim. Um déficiente armazenamento (tempo/temperatura) pode favorecer o desenvolvimento microbiano, comprometendo o produto final.	0	Não. Uma elevada carga microbiana na base pode não ser totalmente destruída no tratamento UHT.			PCC
			Tempo e temperatura de armazenamento da mistura	P	1	Sim. Avaliação e qualificação de fornecedores e a própria medida de	0	Não. O armazenamento refrigerado é apenas preventivo.	1	Sim. Um déficiente armazenamento (tempo/temperatura) pode favorecer o desenvolvimento	0	Não. Uma elevada carga microbiana na mistura pode não ser totalmente destruída no			PCC

			Tratamento de grão (crivos, separação por gravidade, magnetos, leitor optico)	E	-	-	-	-	-	-	-	PrO
Alérgenos	N2	Baixo	Avaliação e qualificação de fornecedores	P	-	-	-	-	-	-	-	PrO

Legenda:

PCC – Ponto Crítico de Controlo

PRO – Pré-Requisito Operacional

F – Perigo Físico

Q – Perigo Químico

M – Perigo Microbiológico

N – Perigo Nutricional

PSA – Perigo segurança alimentar geral

PSAe – Perigo segurança alimentar específico

ANEXO MANUAL HACCP PLANO DE CONTROLO - PPRO								
Medida de controlo	Documentação	PSAe	Monitorização				Correção	Ações corretivas
			Como	Quando	Quem	Registo		
Avaliação e qualificação de fornecedores	-	Corpos estranhos (pedras, madeira, metais, plásticos, vidro,...)	Verificação da qualificação dos fornecedores dos produtos em utilização.	1x por semana	Qualidade	Registo de controlo (checklist).	Avaliação imediata de fornecedor	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
	-	Contaminantes (metais pesados, pesticidas, patulina, ocratoxina, Benzopireno,...)						
	-	Cereais com glúten						
	-	Alérgenos						
Tratamento de grão (crivos, separação por gravidade, magnetos, leitor optico)	-	Corpos estranhos (pedras, madeira, metais, plásticos, vidro,...)	Observação em pontos de amostragem.	1x por turno	Colaborador de sector.	Registo de controlo.	Filtros de processo. Decantadores.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
		Cereais com glúten					Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
Desactivação/ Desodorização	-	Inibidor da tripsina	Temperatura	Registo contínuo	Supervisor de turno	Informático	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não
	-	Bolores, Carga microbiana variada e não específica, dependente do ingrediente, mas não identificado nenhum						

		mencionado no Regulamento 2073/2004 e modificações						Conformidade
Formulação de produto	-	Aditivos com limites máximos legais de incorporação	Verificação de registo de produção	contínuo	Supervisor de turno / Qualidade	automático	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
Filtros de processo	-	Corpos estranhos (pedras, madeira, metais, plásticos, vidro,...)	Pressão	Durante limpeza de fim de produção	Operador	Registo de limpeza	(pressão elevada - colmatagem): accionar outro filtro. Substituição de filtro colmatado. (pressão baixa): verificar restantes filtros do processo.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade

Legenda:

PSA – Perigo segurança alimentar geral;

PSAe – Perigo segurança alimentar específico

ANEXO MANUAL HACCP									
PLANO DE CONTROLO – Pontos Críticos de Controlo (PCC)									
Medida de controlo	Documentação	PSAe	Limite crítico de controlo	Monitorização				Correção	Ações corretivas
				Como	Quando	Quem	Registo		
Armazenamento da base	-	Bolores, Carga microbiana variada e não específica, dependente do ingrediente, mas não identificado nenhum mencionado no Regulamento 2073/2004 e modificações	Temperatura máx 5 °C, após estabilização	Monitorização de temperatura	Antes da utilização	Supervisor de turno	Impresso "Controlo produção"	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
			Tempo máx. 3 dias	Controlo de data de produção / validade em SAP	Antes da utilização	Supervisor de turno	Impresso "Controlo produção"	Tratamento UHT; Reposição de processo	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
Armazenamento da mistura	-	Bolores, Carga microbiana variada e não específica, dependente do ingrediente, mas não identificado nenhum mencionado	Temperatura máx 5 °C	Monitorização de temperatura	Antes da utilização	Supervisor de turno	Impresso "Controlo produção"	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
			Tempo máx. 24 horas	Controlo de data de produção / validade em SAP	Antes da utilização	Supervisor de turno	Impresso "Controlo produção"	Tratamento UHT; Reposição de processo	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade

		no Regulamento 2073/2004 e modificações							
Tratamento UHT	-	Bolors, Carga microbiana variada e não específica, dependente do ingrediente, mas não identificado nenhum mencionado no Regulamento 2073/2004 e modificações	Depende produto para produto: binómio tempo (holding tube) / Temperatura.	Monitorização de temperatura e verificação/correção de alarmes em caso de desvio VTIS	Registo contínuo	Supervisor de turno	Informático (Tetra Pak)	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
						Paragem automática quando quebra		Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
				Seleção de receita/programa de pasteurização no equipamento	Antes de pasteurização	Supervisor de turno	Impresso "Controlo produção"	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
Armazenamento Asseptico	-	Bolors, Carga microbiana variada e não específica, dependente do ingrediente, mas não identificado nenhum	T105°C na barreira de vapor	Monitorização barreira de vapor e verificação/correção de alarmes em caso de desvio	Registo contínuo	Supervisor de turno	Informático (Tetra Pak)	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade
						Paragem automática quando quebra		Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade

		mencionado no Regulamento 2073/2004 e modificações							Conformidade
Controlo do Peróxido no Enchimento asséptico	-	Bolores, Carga microbiana variada e não específica, dependente do ingrediente, mas não identificado nenhum mencionado no Regulamento 2073/2004 e modificações	min 30% e máx. 55%	Concentração de peróxido de hidrogénio	Antes de produção e se < 35% de 30 em 30 minutos até 30%	Operador da máquina da enchimento	Registo de produção	Segregação e inspeção de produto afectado.	Direcção da Qualidade efectua o tratamento da Não Conformidade

Legenda:

PCC – Ponto Crítico de Controlo

PSAe – Perigo segurança alimentar específico

Anexo 4 – Procedimentos analíticos**Tabela 27 – Procedimento implementado para quantificação do teor de proteína**

Preparar Solução NaOH 40%	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 400 g de NaOH 2. Dissolver em água destilada 3. Colocar em Balão volumétrico de 1L e aferir até à marca.
Preparar Receiver solution (10L)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 400 g de H₃BO₃ 2. Dissolver em 5-6L de água destilada bastante quente 3. Misturar 4. Perfazer volume de 9L 5. Deixar arrefecer a solução 6. Adicionar 100 mL de solução de Verde Bromocresol (100 mg / 100mL de metanol) 7. Adicionar 70 mL de solução vermelho de metilo (100 mg / 100 mL de metanol) 8. Adicionar água destilada até perfazer 10L
Preparar Digestor	<ol style="list-style-type: none"> 1. Programar o digestor para as condições: <ol style="list-style-type: none"> a. Temperatura: 420 °C b. Tempo: 75 minutos
Digestão da Amostra	<ol style="list-style-type: none"> 2. Triturar amostra 3. Pesar 1,7 ± 0,0001 g de amostra*(conforme %N) 4. Colocar no Tubo de Digestão 250 mL 5. Adicionar 2 kjeltabs 6. Adicionar 10 mL de H₂SO₄ concentrado e agitar cuidadosamente 7. Esperar 15 minutos 8. Adicionar 5 mL de H₂O₂ a 27% e agitar cuidadosamente 9. Esperar mais 15 minutos antes de colocar a amostra no digestor 10. Colocar a rack dos tubos no digestor (previamente aquecido a 420°C) 11. Ligar exaustão da hotte e scrubber no máximo; 12. Após cerca de 15 minutos, colocar scrubber em automático; 13 Após 75 minutos, remover do sistema a rack e deixar arrefecer durante 15 minutos
Destilação	<ol style="list-style-type: none"> 14. Aquecer o destilador: <ol style="list-style-type: none"> i. Colocar um tubo de kjeldhal no destilador; ii. Fechar a porta manualmente; iii. Carregar o programa "steam". <p><i>Nota: Se o destilador não é utilizado à + de 2 dias, agitar o depósito receiver solution e purgar a quantidade do tubo.</i></p> 15. Seleccionar programa no destilador: <ol style="list-style-type: none"> a. Diluição: 80 mL de H₂O - Tempo: 5 segundos b. Alkali: 50 mL de NaOH - Tempo: 4 minutos c. Receiver solution: 30 mL d. Tube drain Mode safe Steam: 100%

Destilação	16. Proceder à titulação do conteúdo no receiver flask, com HCl 0,2N, até se atingir uma colocação: cinzento
Cálculos	$\% \text{ Azoto} = \frac{(T - B) \times 14,007 \times N \times 100}{\text{peso da amostra (mg)}}$ $\% \text{ Proteína} = \% \text{ Azoto} \times F$ <p>Em que: F – Factor de conversão do nitrogénio em proteína. No caso dos produtos de soja F = 6,25</p> <p>T – volume de titulação da amostra (mL) B – volume de titulação do branco (mL) N - normalidade para o ácido com 4 casas de decimais</p>

Tabela 28 – Procedimento implementado para quantificação do teor de gordura

Preparação do Soxhlet	1. Programar o soxhlet para as condições: a. Tempo de fervura: 20 minutos b. Tempo de lavagem: 40 minutos c. Tempo de recuperação: 9-10 minutos d. Temperatura: 135 °C
Preparação dos copos de extracção	2. Colocar os copos de extracção na estufa a uma temperatura de 103°C durante 2 horas 3. Arrefecer no exsiccador 4. Pesar o copo de extracção
Preparação da Amostra	5. Triturar amostra 6. Pesar 1,5 ± 0,0001 g de amostra 7. Colocar a amostra no cartucho 8. Secar a amostra na estufa a uma temperatura de 103°C durante 2 horas 9. Arrefecer no exsiccador
Extracção	10. Colocar no copo 50 mL de éter de petróleo 11. Transferir o cartucho que contém a amostra para o aparelho de Soxtec 12. Conectar o copo ao aparelho de Soxtec 13. Definir o programa de acordo com as instruções de trabalho para o produto a analisar. 14. Iniciar a extracção 15. Terminado o processo desligar o Soxtec 16. Retirar o copo de extracção e colocar no exsiccador 17. Pesar o copo de extracção que contém o resíduo
Cálculos	$\% \text{ Gordura} = \frac{W3 - W2}{W1} \times 100$ <p>Em que: W1 – Peso da amostra (g) W2 – Peso do copo de extracção (g) W3 – Peso do copo de extracção + peso do resíduo (g)</p>

Tabela 29 – Procedimento implementado para determinação do teor de humidade e teor de sólidos

Preparação dos pratos de pesagem	<ol style="list-style-type: none"> Colocar o prato de pesagem na estufa de esterilização à temperatura de 103° C Deixar secar durante 30 minutos Retirar da estufa e arrefecer em exsiccador Pesar o prato
Preparação da Amostra	<ol style="list-style-type: none"> Pesar $10 \pm 0,0001$ g de amostra Colocar a amostra no prato
Secagem	<ol style="list-style-type: none"> Aquecer a estufa de vácuo à temperatura de 100°C Colocar a amostra na estufa Aplicar pressão de 0 Bar Secar a amostra durante 2 horas. Retirar a amostra da estufa Arrefecer em exsiccador Pesar o prato
Cálculos	$\% \text{ Humidade} = \left(1 - \frac{(M_f - M_p)}{M_i} \right) \times 100$ $\% \text{ Teor em sólidos} = 100 - \% \text{ Humidade}$ <p>Em que: Mf – Massa final Mp – Massa prato Mi – Massa inicial</p>

Tabela 30 – Procedimento implementado para quantificação de microrganismos totais

Procedimento	<ol style="list-style-type: none"> Na câmara de fluxo laminar retirar directamente 1mL da amostra Semear em placa de Petri estéril Adicionar cerca de 15 a 20 mL de meio Plate Count Agar (PCA) fundido. Misturar cuidadosamente, por rotação lenta (técnica de incorporação) Deixar solidificar em superfície plana. Inverter as placas Incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas. Retirar as placas Efectuar a contagem
Procedimento Alternativo	<ol style="list-style-type: none"> Adicionar em placa de Petri estéril cerca de 15 a 20 mL de PCA fundido Deixar solidificar em superfície plana. Junto ao bico de bunsen retirar com ajuda de uma ansa, 10 μL de amostra Cuidadosamente efectuar espalhamento por superfície Inverter as placas Incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas.
Cálculos	$N = a \times 10^b \text{ UFC/mL}$ <p>Em que:</p>

	a – nº de colónias contadas b – corresponde à primeira diluição
--	--

Tabela 31 – Procedimento implementado para quantificação da acidez

Preparação da Amostra	1. Pesar $3 \pm 0,0001$ g de amostra 2. Colocar a amostra no erlenmeyer
Preparação da solução de etanol	3. Medir para erlenmeyer 50 mL de etanol 95% 4. Adicionar 0,5 mL de solução de fenolftaleína (10 g/L em metanol) 5. Aquecer em placa de aquecimento até ebulição; 6. Com a temperatura da solução acima dos 70°C, neutralizar com solução de NaOH 0,1 M
Determinação	7. Adicionar à amostra a solução de etanol neutralizada. 8. Agitar até completa homogeneização. 9. Aquecer em placa de aquecimento até ebulição 10. Proceder à titulação da amostra com NaOH 0,5 M
Cálculos	$\text{Acidez} = \frac{1 \times V \times C}{m}$ <p>Em que: V – Volume da solução titulante C – Concentração do titulante m – massa da amostra</p>

Anexo 5 – Formulações e procedimentos adoptados para produção de sobremesa fermentada de soja

Tabela 32 – Formulações e procedimentos testados

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Ingredientes	<ul style="list-style-type: none"> - Base de soja e água; - Pectina; - Amido; - Fermento; - Óleo de girassol; - Emulsionante (E471); - Inulina; - Lactato de cálcio; 	<ul style="list-style-type: none"> - Base de soja e água; - Pectina; - Amido; - Fermento; - Óleo de girassol; - Emulsionante (E471); - Inulina; - Lactato de cálcio; 	<ul style="list-style-type: none"> - Base de soja e água; - Fermento; - Pectina; - Amido; - Óleo de girassol; - Emulsionante (E471); - Xarope Glucose-Frutose; - Sal; - Inulina; 	<ul style="list-style-type: none"> - Base de soja e água; - Fermento; - Amido; - Óleo de girassol; - Emulsionante (E471); - Fosfato tricálcico; - Xarope Glucose-Frutose; - Lecitina; - Açúcar;

Procedimento	<p>1° Juntar 1700mL base de soja com 300mL água de forma a trabalharmos com o teor de proteína pretendido no produto final.</p> <p>Colocou-se a aquecer em placa até 42°C/ 44°C (temperatura de incubação) com agitação.</p> <p>2° Adicionou-se 110gr de amido, 16gr de inulina, 8gr de óleo vegetal, 6gr de emulsionante e 20gr de lactato de cálcio.</p> <p>3° Diluiu-se 5gr de pectina em 40mL de água</p> <p>4° Confirmou-se a temperatura e adicionou-se 0,14gr de fermento.</p> <p>5° Colocaram-se os recipientes a incubar em estufa a 43°C;</p>	<p>1° Adicionaram-se todos os ingredientes sólidos no copo misturador, juntamente com o óleo de girassol e homogeneizou-se;</p> <p>2° A pectina por não ter sido previamente dissolvida a 80°C formou “grumos”. Aqueceu-se por isso o preparado na tentativa de a dissolver;</p> <p>3° Não foi adicionado lactato de cálcio para evitar a coagulação por excesso de cálcio;</p> <p>Inoculou-se o preparado com 0,14g de fermento e colocou-se na estufa a 43°C;</p>	<p>1° Adicionaram-se todos os ingredientes sólidos no copo misturador, juntamente com o óleo de girassol e homogeneizou-se;</p> <p>2° Não foi adicionada pectina;</p> <p>3° Não foi adicionado lactato de cálcio para evitar a coagulação por excesso de cálcio;</p> <p>Inoculou-se o preparado com 0,14g de fermento e colocou-se na estufa a 43°C;</p>	<p>1° Adicionaram-se todos os ingredientes sólidos no copo misturador, juntamente com o óleo de girassol e homogeneizou-se;</p> <p>2° Não foi adicionada pectina e substitui-se o lactato de cálcio por fosfato tricálcico;</p> <p>Inoculou-se o preparado com 0,14g de fermento e colocou-se na estufa a 43°C;</p>
---------------------	---	---	--	---

Observações	Aquando da adição do lactato de cálcio é visível a formação de um coágulo por precipitação das proteínas por excesso de cálcio.	Pelo controlo de pH foi possível verificar que a fermentação é extremamente lenta, praticamente não ocorre.	Com a adição de Xarope de glucose-frutose já foi possível que ocorre fermentação. No entanto o coágulo é muito frágil	Verifica-se que ocorre fermentação de acordo com o esperado e o coágulo obtido apresenta uma estrutura bastante próxima dos iogurtes de leite.
--------------------	---	---	---	--

Anexo 6 - Análise sensorial interna – Bebida de soja original e Bebida de soja com cacau

NUTRE		ANÁLISE SENSORIAL	
IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO			
N.º do Teste	Original	Data do ensaio	
Produto	Bebida de soja		
Identificação			
Alergêneos:	Soja		
Outras menções:			
CONSUMIDOR			
Idade:	<input type="text"/>	Sexo:	F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>

Relativamente ao produto que provou, por favor responda ao questionário abaixo:

Q1. Qual a sua opinião sobre o aspecto do produto?

Desagradável Muito agradável

Q2. Qual a sua opinião sobre a intensidade da cor do produto?

Muito amarelada Agradável/ Adequada

Q3. Qual a sua opinião sobre a intensidade do cheiro do produto?

Desagradável (não gosto) Muito agradável

Q4. Qual a sua opinião sobre a intensidade do sabor a “Beany (feijão; verde)” no produto?

Imperceptível Demasiado intenso

Q5. Qual a sua opinião sobre a intensidade de sal no produto?

Demasiado débil, falta sal Demasiado Salgado

Q6. Qual a sua opinião sobre o sabor em geral?

Desagradável Muito agradável

Q7. Qual a sua opinião sobre a textura do produto na boca?

Desagradável (não gosto) Muito agradável

Q8. Qual a sua apreciação global do produto?

Desagradável (não gosto) Muito agradável

Q9. Este é um produto que compraria?

Definitivamente não compraria Definitivamente compraria

Figura 25 – Folha de prova utilizada na análise sensorial interna de bebidas de soja

Anexo 7 - Análise Sensorial

NUTRE		ANÁLISE SENSORIAL	
IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO			

N.º do Teste	Natural	Data do ensaio	
Produto	Sobremesa Fermentada de Soja		
Identificação			
Alergéneos:	Soja		
Outras menções:			
CONSUMIDOR			
Idade:	<input type="text"/>	Sexo:	F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>

Relativamente ao produto que provou, por favor responda ao questionário abaixo:

Q1. Qual a sua opinião sobre o aspecto do produto?

Desagradável agradável

Q2. Qual a sua opinião sobre a intensidade da cor do produto?

Muito amarelada Agradável/ Adequada

Q3. Qual a sua opinião sobre a intensidade do cheiro do produto?

Desagradável (não gosto) Muito agradável

Q4. Qual a sua opinião sobre o sabor do produto?

Desagradável (não gosto) Muito agradável

Q5. Qual a sua opinião sobre a intensidade de acidez no produto?

Demasiado débil, falta acidez Ideal

Q6. Qual a sua opinião sobre o nível de doçura do produto?

Desagradável. Demasiado amargo Muito agradável (ideal)

Q7. Qual a sua opinião sobre a textura do produto na boca?

Desagradável (não gosto) Muito agradável (ideal)

Q8. Qual a sua opinião sobre a cremosidade do produto na boca?

Desagradável (muito fluído) Muito agradável (ideal)

Q9. Qual a sua apreciação global do produto?

Desagradável (não gosto) Muito agradável.

Q10. Este é um produto que compraria?

Definitivamente não compraria Definitivamente compraria

Figura 26 - Folha de prova utilizada na análise sensorial interna de sobremesas fermentadas de soja