

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA SIMBIÓTICA À BASE DE
CASTANHA-DO-BRASIL

PAULO CEZAR DA CUNHA JÚNIOR

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA SIMBIÓTICA À BASE DE CASTANHA-DO-
BRASIL**

PAULO CEZAR DA CUNHA JÚNIOR

Sob a Orientação da Professora
Dra. Elisa Helena da Rocha Ferreira

e Co-orientação do Professor
Ph.D. Amauri Rosenthal

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimento**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

**Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C972d Cunha Júnior, Paulo Cezar da , 1991-
DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA SIMBIÓTICA À BASE DE
CASTANHA-DO-BRASIL / Paulo Cezar da Cunha Júnior. -
2019.
69 f.: il.

Orientadora: Elisa Helena da Rocha Ferreira.
Coorientadora: Amauri Rosenthal.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.

1. castanha-do-Brasil . 2. bebida fermentada. 3.
Lactobacillus casei. 4. Bebida simbiótica não-láctea.
5. Alimentos funcionais. I. Ferreira, Elisa Helena da
Rocha, 1977-, orient. II. Rosenthal, Amauri, 1960-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

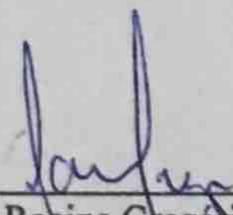
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

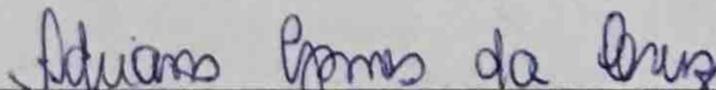
PAULO CEZAR DA CUNHA JÚNIOR

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

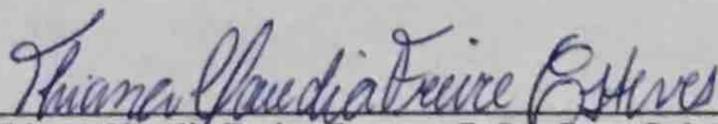
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/02/2019.



Sandra Regina Gregório, D.Sc. UFRRJ
Presidente da Banca



Adriano Gomes Cruz, PhD. IFRJ



Thiana Claudia Freire Esteves, D.Sc. Coca Cola Brasil

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe, Solange, à minha tia, Fia, às minhas irmãs, Andreza e Carol, à minha sobrinha, Manuela, ao meu pai, Paulo Cezar (*in memoriam*) e aos meus avós, Dico, Maria e Dita (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer a importância do outro em sua vida, é reconhecer que não percorreu o caminho sozinho. Essa máxima na Rural se torna tão verdadeira. Longe de casa, sem recursos e com todos os percalços da vida, aqui não fazemos nada sozinho. A individualidade é irreal. Neste momento, eu não poderia deixar de agradecer todos aqueles que tornaram minha caminhada possível e muito mais leve.

Agradeço a Deus, pela vida e por todas as oportunidades que tive até aqui. Por nunca me desamparar, fazendo que apenas minha fé e força de vontade fossem os instrumentos necessários para seguir em frente, me fazendo superar obstáculos e dificuldades.

À minha mãe, Solange, por me apoiar em todas as minhas decisões e ser esse referencial de caráter, amor incondicional, respeito, resiliência e dedicação. Por me ensinar que sempre devemos agradecer por cada dia de vida que temos e que por mais difícil que seja o caminho, nunca devemos nos deixar abater e que devemos lutar contra o mundo para alcançar nossos sonhos. Meu porto seguro!

À minha tia Fia, pela dedicação eterna aos sobrinhos, por estar sempre presente em minha vida (pessoal, acadêmica e profissional) e por ser a prova viva de que podemos sim, abrir mão de tudo e recomeçar, quantas vezes forem necessárias, até que nossas metas sejam cumpridas.

Às minhas irmãs, Andreza e Caroline, por abdicarem de tantas coisas, para que eu pudesse estar aqui hoje, me tornando um mestre. O amor de vocês, muitas vezes na forma de brigas, me fez mais forte e permitiu que eu chegasse até aqui.

À minha sobrinha, Manuela, por recarregar minhas energias com apenas um abraço, por me mostrar que a vida pode ser mais simples do que parece e que a felicidade está nos menores momentos de alegria.

Aos meus avós, Dico, Maria e Dita e ao amor mais puro que já conheci, por me mostrarem que conhecimento e educação vão muito além de diplomas, escolas e Universidade.

Ao meu pai, Paulo Cezar, que mesmo de longe, sei que zela por mim. Obrigado por me dar esse espírito livre e cheio de vontade de vencer.

À toda minha família, Felix e Cunha, por todo apoio, por compreenderem cada ausência e por serem a melhor torcida que eu poderia ter.

À minha orientadora, Elisa, por acreditar no meu potencial e ser essa mãezona, companheira, preocupada e parceira. Agradeço também pelo comprometimento à pesquisa, pelos conselhos, pelos incentivos, por me ouvir e respeitar minhas opiniões, por sempre querer o meu bem, por me propiciar oportunidades únicas e por me instigar sempre ir além. Tenho muito orgulho em ter sido seu primeiro orientado de mestrado. Espero ser o primeiro orientado de doutorado também. Que nossa parceria seja eterna e sempre com emoção. Poderíamos chorar em muitos momentos, mas levar a vida na risada é muito melhor e mais divertido.

À professora Sandra Gregório, por ser esse referencial do profissional que quero ser no futuro, por se dedicar e se entregar de corpo e alma à profissão de professor e educador. Obrigado por me mostrar que o conhecimento está em qualquer relação humana, seja numa sala de aula ou numa casa no meio da Floresta Amazônica. Ter você ao meu lado nessa caminhada foi fundamental para que eu pudesse evoluir tanto como pessoa e profissional. Grande encontro da vida!

Ao meu co-orientador, Amauri Rosenthal, por acreditar no nosso projeto e por não medir esforços em torna-lo realidade.

À Rosires, por ceder por diversas vezes seu tempo e conhecimentos, para que meu projeto de pesquisa pudesse se concretizar.

À minha primeira mãe ruralina, a primeira a ver o profissional que existe dentro de mim: Dina. Obrigado por todo carinho e amor. Nunca esquecerei dos seus ensinamentos e broncas, mas, acima de tudo, do seu profissionalismo. Muito do que sou hoje devo às oportunidades que você me deu.

À Mariana Machado, por ser essa pessoa tão boa e solícita, que faz o ditado “Fazer o bem sem olhar a quem” tão real. Por toda a dedicação e carinho, meu muito obrigado.

À Ivanildinha, por todo auxílio, apoio e conselhos ao longo do meu mestrado. Você é um exemplo para nunca desistirmos, mesmo que tudo na vida diga o contrário.

À Lucimar, por todos os conselhos e por sempre zelar pelo meu melhor, abrindo meus olhos e me dando broncas.

À Maria Ivone, por apoiar meu projeto de pesquisa, mesmo não tendo nada a ganhar com tal atitude e por me fornecer oportunidade de me aprimorar como futuro professor.

À Rosa Luchese, por ter sido tão atenciosa com meu projeto de pesquisa de forma tão voluntária.

Aos técnicos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Robertinho, Edlene, Fernandão e Vinicius, por toda a ajuda ao decorrer desses dois anos. Se defendo hoje, devo parte dessa vitória a vocês, pelo comprometimento, prestatibilidade e disponibilidade.

Aos meus braços direito e esquerdo aqui na Rural, Clarissa e Camila, por serem tão companheiras, por me propiciarem minhas melhores risadas e prints, por estarem do meu lado sempre, para o que der e vier. Não sei como seria a minha vida sem vocês para caminhar comigo.

À “my friend”, Mariá Toledo, por ser uma amiga tão presente e dedicada e por sempre ver o lado bom das coisas e acreditar que tudo pode melhorar. Obrigado por se fazer tão presente em minha vida.

À minha amiga Thais, por ser uma pessoa tão fiel, que entrou na minha vida do nada e hoje é uma das pessoas que mais torce pelo meu sucesso.

À minha turma de mestrado (Turma de Eita), Marcus, Renata Vaqueiro, Gabriela e Aline, por todas as sessões de terapia em grupo semanais no Caffé Itália, amizade e solidariedade.

Aos “My Friends” no Laboratório Instrumental do PPGCTA, Matheus, Jéssica, Miuri e Bruna, por tornarem as análises mais divertidas, por todas as sessões de “Happy Days”, pelas discografias do “É o Tchan!” e “Sandy & Júnior” e por resolverem qualquer problema com um chopp do Frangão ou um sorvetezinho na Sol & Neve.

À minha amiga Marcela Alcantara, pelo apoio técnico à minha pesquisa e pelo companheirismo desde a minha época de LASI – Embrapa.

Às minhas amigas Thays, Carol, Laís Grom, Paula Coutinho, Myllene e Danielle, que mesmo não convivendo diariamente, foram pessoas fundamentais para que eu chegasse até aqui.

A todos meus amigos da UFRRJ, em especial, meus eternos companheiros de Rural, CdS e Agregados, por serem verdadeiros irmãos e me acompanharem desde 2010, fazendo com que a vida em Seropédica fosse mais leve e divertida. #CdSvive

Aos meus cúmplices, que tornaram esse projeto de pesquisa viável, Jade, Lucas, Mayara, Lorena e Tayná. Sem a ajuda de vocês nunca teria chegado tão longe. Obrigado pela dedicação e amor por nosso grupo de pesquisa.

À Luciana, Edvar, Juliélmo e Sr. Assis, por me proporcionarem uma das experiências mais marcantes em minha vida, minha viagem ao Acre, que teve impacto direto na execução e elaboração deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA, por, mesmo com recursos escassos, oferecer um ensino de qualidade, sempre buscando a evolução e melhoria dos cursos de Mestrado e Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa durante todo o período do Curso de Mestrado, permitindo que eu desse continuidade aos meus estudos e o título de Mestre fosse obtido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pela concessão de bolsas de Iniciação Científica, viabilizando a realização do projeto de pesquisa proposto.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, meu eterno caso de amor e ódio (Muito mais amor do que ódio), que possibilitou que eu evoluísse como pessoa e que tornasse um profissional. Tenho orgulho em ter me tornado Engenheiro de Alimentos e agora Mestre pela Rural, instituição que sempre será meu Lar.

De antemão, à banca pela atenção e ao tempo dedicado as correções que certamente enriquecerão esta dissertação.

EPÍGRAFE

“Mas mesmo assim, ainda guarda o direito

De algum antepassado da cor

Brigar sutilmente por respeito

Brigar bravamente por respeito

Brigar por justiça e por respeito (Pode acreditar)

De algum antepassado da cor

Brigar, brigar, brigar, brigar”

(A carne – Elza Soares)

“Mas é preciso ter força

É preciso ter raça

É preciso ter gana sempre”

(Maria, Maria – Milton Nascimento)

RESUMO

Cunha Júnior, Paulo Cezar da. **Desenvolvimento de bebida simbiótica à base de castanha-do-Brasil**. 2019. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Os “leites vegetais” são uma tendência mercadológica e de consumo em virtude do aumento de casos de intolerantes à lactose, alérgicos às proteínas do leite e adeptos de regimes alimentares e/ou ideológicos (vegetarianismo e veganismo). Sua elaboração, industrial ou doméstica, consiste na utilização de grãos, cereais, tubérculos, oleaginosas e frutas para a fabricação de extratos hidrossolúveis, visando a substituição do leite e seus derivados. Contudo, sua comercialização ainda é limitada e há pouquíssimas opções de “leites vegetais” com alegação funcional. Nesse contexto, a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) destaca-se por ser uma noz típica da região Amazônica, que apresenta alta qualidade nutricional, elevados teores de lipídios (entre 60% e 70%), proteínas de alto valor biológico (entre 15% e 20%) e é uma reconhecida fonte de selênio. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma bebida fermentada à base de castanha-do-Brasil com potencial simbiótico, com a utilização da noz *in natura*, a fim de explorar a qualidade nutricional e biológica desta matéria, propiciando agregar valor e evidenciar a viabilidade do desenvolvimento e manutenção do *Lactobacillus casei* em matriz vegetal. Como prebiótico, utilizou-se inulina. Após 12 horas de fermentação, a bebida foi caracterizada, tendo os teores de umidade, lipídios, proteínas, carboidratos, fibras e cinzas mensurados e teve sua estabilidade física (pH e cor instrumental), química (acidez em termos de ácido láctico) e microbiológica (bolors e leveduras, *Salmonella* spp. e coliformes totais e termotolerantes) avaliada frente ao armazenamento sob refrigeração por 28 dias. A sobrevivência *in vitro* e viabilidade do micro-organismo também foram avaliadas. A bebida apresentou escores intermediários em relação a aceitabilidade.

Palavras-chave: castanha-do-Brasil; bebida fermentada; *Lactobacillus casei*; bebida simbiótica não-láctea.

ABSTRACT

Cunha Júnior, Paulo Cezar da. **Development of a symbiotic drink based on Brazil nuts.** 2019. 69 p. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Vegetable "milks" are a market and consumer trend due to the increase in cases of lactose intolerants, allergic to milk proteins and adherents of dietary and/or ideological regimes (vegetarianism and veganism). Its industrial or domestic elaboration consists in the use of grains, cereals, tubers, oilseeds and fruits for the manufacture of aqueous extracts, aiming at the substitution of milk and milk derivatives. However, its commercialization is still limited and there are very few options of vegetable "milks" with functional claim. In this context, Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) stands out as a typical nut of the Amazon region, which presents high nutritional quality, high lipid levels (between 60% and 70%), proteins of high biological value (between 15% and 20%) and a recognized source of selenium. The objective of this work was the development and characterization of a Brazil nuts-based fermented beverage with symbiotic potential, using *in natura* nut, in order to explore the nutritional and biological quality of this matter, favoring add value and evidence the viability of the development and maintenance of *Lactobacillus casei* in plant matrix. As prebiotic, inulin was used. After 12 hours of fermentation, the beverage was characterized, having the contents of moisture, lipids, proteins, carbohydrates, fibers and ash measured and had its physical (pH and instrumental color), chemical (acidity in terms of lactic acid) and microbiological stability (Molds and yeasts, *Salmonella* spp., total and thermotolerant coliforms) evaluated before storage under refrigeration for 28 days. Survival *in vitro* and viability of the microorganism were also evaluated. The drink presented intermediate scores in relation to the acceptability.

Key words: Brazil nuts; fermented drink; *Lactobacillus casei*, non-dairy symbiotic drink.

LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists
- APHA – American Public Health Association
- APLV – Alergia às proteínas do leite de vaca
- BN – Brazil nuts (castanha-do-Brasil)
- BNE – Brazil nut aqueous extract containing inulin, pectin and demerara sugar (Extrato aquoso de castanha-do-Brasil adicionada de inulina, pectina e açúcar demerara)
- CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CFU - Colony Forming Unit (Unidade Formadora de Colônia)
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
- FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- FOS – Frutooligossacarídeo
- GOS - Galactooligossacarídeo
- H.B.K – Humboldt, Bonpland e Kunth
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- IAL – Intolerância à lactose
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IgE – Imunoglobulina E
- IMAFLORA – Instituto de Manejo e Certificação Florestal e Agrícola
- LA – Acidez em termos de ácido láctico
- LAB – Bactérias Ácido Lácticas
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MPN – Número mais provável
- MRS – Ágar de Man, Rogosa e Sharpe
- MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados
- RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
- SBND – Bebida Simbiótica de castanha-do-Brasil (Symbiotic Brazil nut drink)

SFA – Ácidos graxos saturados
SS – Sólidos solúveis
SVB – Sociedade Vegetariana Brasileira
UNIRIO – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
VLDL – Lipoproteína de muita baixa densidade
C:12 – Ácido láurico
C24:0 – Ácido lignocérico
C6:0 – Ácido caprótico
C10:0 – Ácido cáprico
C11:0 – Ácido hendecanóico
C14:0 – Ácido mirístico
C16:0 – Ácido palmítico
C16:1 – Ácido palmitoleico
C17:0 – Ácido margárico
C18:0 – Ácido esteárico
C18:1 – Ácido oléico
C18:2 – Ácido linoléico
C18:3 – Ácido γ -linolênico
C20:0 – Ácido araquídico
C20:1 – Ácido gadoléico
C22:0 – Ácido behênico
C22:1 – Ácido cetoléico
Ala – Aminoácido alanina
Arg – Aminoácido arginina
Asp – Aminoácido aspartato (ácido aspártico)
Cys – Aminoácido cisteína
Glu – Aminoácido glutamato (ácido glutâmico)
Gly – Aminoácido glicina
His – Aminoácido histidina
Ile – Aminoácido isoleucina
Leu – Aminoácido leucina
Lys – Aminoácido lisina

Met – Aminoácido metionina

Phe – Aminoácido fenilalanina

Pro – Aminoácido prolina

Ser – Aminoácido serina

Thr – Aminoácido treonina

Trp – Aminoácido triptofano

Tyr – Aminoácido tirosina

Val – Aminoácido valina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Molécula de β -lactoglobulina.....	36
Figura 2 – Molécula de α -lactoalbumina.....	36
Figura 3 – Molécula de Lactose.....	36
Figura 4 – Bebidas da marca Vida veg®.....	38
Figura 5 – Bebida da marca Nogurt®.....	38
Figura 6 – Bebidas das marcas Fresco® e Batavo®.....	38
Figura 7 – Curva de alteração de pH durante processo fermentativo.....	51
Figura 8 – Curva de desenvolvimento do <i>L. casei</i> durante processo fermentativo.....	52
Figura 9 – Changes in pH during during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (0 – 28 days)	60
Figura 10 – Changes in acidity during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (0 – 28 days) in terms of lactic acid.....	60
Figura 11 – Changes in soluble solids during during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (0 – 28 days)	61
Figura 12 – Evaluation of viability of <i>Lactobacillus casei</i> during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (4 weeks)	63
Figura 13 – Survival of <i>Lactobacillus casei</i> exposed to simulated gastrointestinal conditions <i>in vitro</i> for up to 360 minutes during 4 weeks of storage (0 days – open circles and 28 days – solid circles)	64
Figura 14 – Sensory acceptance of symbiotic Brazil nuts drink.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de macronutrientes e umidade da Castanha-do-Brasil.....	24
Tabela 2 – Ocorrência de minerais na castanha-do-Brasil.....	25
Tabela 3 – Ocorrência de ácidos graxos saturados e insaturados em castanha-do-Brasil.....	27
Tabela 4 – Ocorrência de aminoácidos essenciais e não-essenciais na castanha-do-Brasil.....	29
Tabela 5 – Perda de aminoácidos devido ao beneficiamento da castanha-do-Brasil.....	29
Tabela 6 – Decréscimo do pH e enumeração do <i>L. casei</i> - Planejamento fatorial.....	51
Tabela 7 – Chemical composition of aqueous extract of Brazil nuts added with inulin, pectin and demerara sugar (BNE) e symbiotic Brazil nuts drink (SBND)	59
Tabela 8 – Values of pH, soluble solids (SS) and acidity in lactic acid (LA) of symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.....	59
Tabela 9 – Colour parameters of symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.....	61
Tabela 10 – Microbiological quality and enumeration of probiotic count in symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.....	62
Tabela 11 – Survival of <i>Lactobacillus casei</i> after gastrointestinal resistance <i>in vitro</i> in symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.....	63
Tabela 12 – Sensory scores of symbiotic Brazil nuts drink (SBND)	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Componentes com alegação de propriedade funcional.....	22
Quadro 2 – Efeitos benéficos ocasionados pela ingestão de probióticos.....	35
Quadro 3 – Benefícios ocasionados pela ingestão de <i>Lactobacillus casei</i>	37
Quadro 4 – Propostas de “leites vegetais” fermentados.....	43
Quadro 5 – Níveis de temperatura, tempo, inulina e pectina.....	43

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Grau de concentração ou pureza de uma cor (C^*)	57
Equação 2 – Diferença de tonalidade ($^{\circ}h$)	57

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
OBJETIVOS	20
Objetivo Geral.....	20
Objetivos Específicos	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	22
1. CASTANHA-DO-BRASIL	23
1.1. Aspectos Gerais	23
1.2. Composição Química.....	24
1.3. Qualidade nutricional das frações lipídica e proteica da castanha-do-Brasil	25
1.4. Mercado	30
2. ALIMENTOS FUNCIONAIS	31
2.1. Aspectos Gerais	31
2.2. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos	32
2.3. <i>Lactobacillus casei</i>	34
3. “LEITES VEGETAIS”	35
3.1. Aspectos Gerais	35
3.2. Intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite, vegetarianismo e veganismo	35
3.3. “Leites vegetais” fermentados	37
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II - ENSAIOS PRELIMINARES	49
CAPÍTULO III	53
DEVELOPMENT OF A NON-DAIRY DRINK WITH SYMBIOTIC POTENTIAL BASED ON BRAZIL NUTS FERMENTED BY <i>Lactobacillus casei</i> WITH THE ADDITION OF INULIN	53
ABSTRACT	54
1. INTRODUCTION	55
2. MATERIALS AND METHODS	56
2.1. Materials used	56
2.2. Preparation of Brazil nuts and their aqueous extract	56
2.3. Preparation of the symbiotic Brazil nut drink (SBND)	56

2.4. Physico and chemical analyses	56
2.4.1. Chemical composition.....	56
2.4.2. Analysis of physical and chemical quality during 4 weeks of storage.....	57
2.5. Microbiological analyses	57
2.5.1. Microbiological quality analysis during 4 weeks of storage.....	57
2.6. Sensory evaluation	58
2.7. Statistical analysis.....	58
3. RESULTS AND DISCUSSION	58
3.1. Physico and chemical analyses	58
3.1.1. Chemical composition.....	58
3.1.2. Physical and chemical quality analyses during 4 weeks of storage.....	59
3.2. Microbiological analysis.....	62
3.2.1. Analysis of microbiological quality during 4 weeks of storage.....	62
3.2.2. Enumeration of probiotic count and survival after gastrointestinal resistance during 4 weeks of storage	62
3.3. Sensory evaluation.....	64
4. CONCLUSION	65
REFERENCES	66
CONCLUSÃO GERAL	69

INTRODUÇÃO GERAL

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K), comercialmente conhecida como castanha-do-Pará, é um dos principais produtos florestais não madeireiros da Amazônia, apresentando grande interesse comercial, uma vez que, encontra-se consolidada e estabelecida no mercado interno e externo, seja para uso doméstico ou industrial, em diversos segmentos, tais como alimentício, cosmético, farmacêutico e energético (KLUCZKOVSKI; LIMA; OLIVEIRA, 2016).

A qualidade nutricional desta oleaginosa é um fator de destaque: 60 – 70% de lipídios, onde observa-se uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, 15 – 20% de proteínas de alto valor biológico, ácido fenólicos e flavonoides, vitaminas E e B6 e quantidades significativas de minerais, tais como fósforo, cálcio, magnésio, potássio, zinco, manganês, cobre e, em especial, selênio (CARDARELLI; OLIVEIRA, 2000; MARTINS et al., 2012). O selênio é um micromineral de suma importância para o metabolismo humano, visto que apresenta ação antioxidante em processos metabólicos, além de atuar em mecanismos regulatórios, associados à tireoide (YANG, 2009).

Mesmo apresentando um alto valor nutricional, a castanha-do-Brasil ainda é pouco consumida, em virtude à prática de altos valores (custos) de comercialização e baixa industrialização. Desta forma, torna-se importante sua inserção nos hábitos alimentares dos brasileiros, através de sua incorporação em formulações já conhecidas, ou ainda, sendo utilizada como matéria-prima na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos (CONAB, 2015).

Atualmente, a principal forma de consumo desta amêndoa é in natura. Observa-se também a comercialização da castanha-do-Brasil de formas variadas: salgada, desidratada, coberta com chocolate, mel e açúcar, estando presente em elaborações de biscoitos, cookies, combinadas com amêndoas, nozes, cereais e frutas desidratadas, barras de cereais e *nuts*, bolos e sorvetes (FREITAS; NAVES, 2010; SANTOS, 2012). Além disso, existem, de forma discreta, estudos que utilizaram a castanha-do-Brasil como matéria-prima para o desenvolvimento de extratos hidrossolúveis e na elaboração de bebidas mistas (FELBERG et al., 2004; KLUCZKOVSKI; LIMA; OLIVEIRA, 2016)

A utilização de proteínas de origem vegetal para a elaboração de alimentos encontra-se em constante expansão, em virtude dos problemas ocasionados pela ingestão de lácteos por intolerantes à lactose e/ou alérgicos às proteínas do leite, além do aumento expressivo de adeptos do veganismo e vegetarianismo estrito (KANDYLIS et al., 2016).

Atualmente, a alternativa mais utilizada é a soja. Todavia, seu extrato apresenta uma sensação desagradável ocasionada na boca (*chalkness*), causada por fragmentos de fibras e pelo desenvolvimento de sabor e aroma indesejáveis, formados ao decorrer do processamento e armazenamento, reduzindo sua aceitabilidade entre os consumidores. Desta forma, a castanha-do-Brasil aparece como uma excelente alternativa para o desenvolvimento de novos produtos, uma vez que se trata de uma matéria-prima nativa, sensorialmente aprazível e com elevada qualidade nutricional (FELBERG et al., 2004; FIORAVANTE, 2015).

Poucas são as pesquisas que fazem uso do extrato hidrossolúvel da castanha-do-Brasil para a elaboração de novas bebidas, funcionais ou não. Os alimentos funcionais são alimentos específicos ou componentes alimentares fisiologicamente ativos que melhoram a saúde e que possuem comprovados efeitos metabólicos positivos e de redução de doenças (HASLER, 1998).

A alegação funcional por meio de probióticos ocorre através da adição de micro-organismos viáveis que exibem efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro após a ingestão, devido à melhoria das propriedades da microbiota (VENTURINI FILHO, 2010), além de reduzir a resistência do crescimento de micro-organismos patogênicos, melhoria da digestão da lactose, estimulação do sistema imune, sendo capazes também de sintetizar várias vitaminas e aumentar a biodisponibilidade de minerais (CHAN; ZHANG, 2005; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

Os prebióticos são componentes que, quando metabolizados, são capazes de estimular o crescimento seletivo de um grupo limitado de micro-organismos, mais precisamente, os probióticos. Sua fermentação propicia mudança no perfil de micro-organismos pertencentes a microbiota e tem impacto direto sobre a atividade microbiana. Os principais prebióticos utilizados na indústria alimentícia são compostos por carboidratos, em especial, galactooligossacarídeo, frutooligossacarídeo e inulina. Porém, compostos como polifenóis e ácidos graxos poli-insaturados já tiveram alegação prebiótica comprovada (VALCHEVA; DIELEMAN, 2016)

Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma bebida fermentada à base de castanha-do-Brasil, adicionada de inulina (composto com alegação prebiótica), açúcar demerara e pectina e avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* como probiótico em uma matriz vegetal, a fim de explorar a alta qualidade nutricional desta matéria-prima.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver e caracterizar uma bebida fermentada à base de castanha-do-Brasil com potencial simbiótico, utilizando *Lactobacillus casei* e inulina.

Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* como probiótico em uma matriz vegetal (extrato de castanha-do-Brasil - *Bertholletia excelsa* H.B.K);
- ✓ Determinar a composição centesimal da bebida fermentada;
- ✓ Avaliar as alterações de pH, acidez em termos de ácido láctico, sólidos solúveis e cor instrumental durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C);
- ✓ Avaliar a qualidade microbiológica e determinar a vida útil da bebida fermentada durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C);
- ✓ Avaliar a sobrevivência do *Lactobacillus casei* frente à simulação das condições do trato gastrintestinal *in vitro* durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C);
- ✓ Avaliar a aceitabilidade da bebida fermentada frente ao consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDARELLI, H. R.; OLIVEIRA, A. J. Conservação do leite de castanha-do-Pará. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 617-622, 2000.
- CHAN, E. S.; ZHANG, Z. Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in an acidic medium. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3346-3351, 2005.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Proposta de Preços Mínimos Safra 2015-2016. Produtos Regionais. Produtos da Sociobiodiversidade**, v. 2, 159 p., 2015.
- FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S. C. de; MODESTA, R. C. D. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 609-617, 2009.
- FIORAVANTE, M. B. **Elaboração, caracterização e aceitabilidade de bebida fermentada saborizada à base de extrato hidrossolúvel da amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vogel)**. Campo Grande, 2015. 99p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2015.
- FREITAS, J. B; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n.2, p. 269-279, 2010.
- HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention na health promotion. **Food Technology**, v. 52, n. 11, p. 63-68, 1998.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Extração Vegetal e Silvicultura**. v. 30, 48 p., 2015.
- KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 58-63, 2016.
- KLUCZKOVSKI, A.; LIMA, N.; OLIVEIRA, M. K. Brazil nut powdered milk properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.40, p. 1-6, 2016.
- MARTINS, M.; PACHECO, A. M.; LUCAS, A. C. S.; ANDRELLO, A. C.; APPOLONI, C. R.; XAVIER, J. J. M. Brazil nuts: determination of natural elements and aflotoxin. **Acta Amazônica**, v. 42, n. 1, p. 157-164, 2012.
- SANTOS, O. V. dos. **Estudos das potencialidades da castanha-do-Brasil: produtos e subprodutos**. 2012. 214 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- VALCHEVA, R.; DIELEMAN, L. A. Prebiotics: Definition and protective mechanisms. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, p. 27-37, 2016.
- VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: na update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.
- VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Editora Blucher, 2010.
- YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p.1573-1580, 2009.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA* **(Castanha-do-Brasil; Alimentos Funcionais; “leites vegetais”)**

***Partes de manuscritos a serem submetidos para publicação nas revistas Acta Amazônica (Qualis B2 – Ciência de Alimentos) e Brazilian Journal of Microbiology (Qualis B1 – Ciência de Alimentos)**

1. CASTANHA-DO-BRASIL

1.1. Aspectos Gerais

A castanheira-do-Brasil é uma das árvores de maior importância para região Amazônica, uma vez que sua exploração acarreta em impactos sociais, econômicos e políticos (MYERS; NEWTON; MELGAREJO, 2000). Além disso, é uma das espécies de maior porte da Amazônia Ocidental, podendo apresentar 50 m de altura e um diâmetro médio de 2 m. Salomão e colaboradores (2006) relataram a existência de exemplares com diâmetros superiores a 3 m. Há registros de espécimes que apresentam idade superior a 400 anos. Ressalta-se que alguns estudiosos acreditam que possam haver exemplares milenares (SALOMÃO, 1991; CAMARGO et al., 1994; SALOMÃO et al., 2006).

Sendo um dos principais recursos de interesse do extrativismo não-madeireiro da região Amazônica, a exploração das castanheiras-do-Brasil concentra-se nos estados do Acre, Amazonas e Pará, representando 80% do proveito. Os estados de Roraima, Amapá, Mato Grosso e Rondônia representam 20% da exploração dessa espécie (BAYMA et al., 2014). A nível mundial, a castanha-do-Brasil pode ser encontrada em países como Bolívia, Venezuela, Colômbia, Guianas e Peru. Além disso, observa-se a existência de castanhais, de forma discreta, em países da África Ocidental (GUARIGUATA et al., 2017).

A classificação botânica da castanheira-do-Brasil é definida nos seguintes níveis: Divisão: *Angiospermae*; Classe: *Dicotyledonea*; Ordem: *Myrtiflorae*; Família: *Lecythidaceae*; Gênero: *Bertholletia*; Espécie: *excelsa*. Seu período de floração ocorre entre os meses de outubro e dezembro. A maturação dos frutos em 14 ou 15 meses, caindo entre os meses de dezembro e fevereiro, podendo variar de acordo com as condições meteorológicas, climáticas e do solo, além da interferência pelo beneficiamento aplicado (YANG, 2009).

Denominado de ouriço, o fruto da castanheira-do-Brasil tem formato capsular esférico, apresentando em seu interior as sementes, que se encontram entre 12 a 24 unidades. As sementes possuem uma casca com coloração marrom escura e em seu interior encontram-se as amêndoas, que é a parte comestível do fruto. As amêndoas apresentam uma película também de coloração escura, formato alongado e cilíndrico irregular, com polpa na cor bege (YANG, 2009). As amêndoas da castanheira recebem a denominação de castanha-do-Brasil.

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) é um alimento de alta qualidade nutricional e fonte de compostos de alta qualidade biológica (FERREIRA et al., 2006). Sua principal forma de consumo e comercialização é in natura. Entretanto, é possível observar sua exploração para a obtenção de óleos, farelo, torta ou extrato. Relatos indicam que, antes mesmo da colonização portuguesa, a castanha-do-Brasil já se encontrava presente na alimentação indígena, compondo mingaus e elaborações com farinha de mandioca. Seu sabor e aroma sensorialmente agradável fizeram com que os colonizadores já exportassem a castanha-do-Brasil para Europa, em especial, para a Holanda (ROSENGARTEN, 1984; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Os primeiros estudos sobre esta noz ocorreram no ano de 1808, pelos pesquisadores Humboldt e Bonpland. O Ministério da Agricultura determinou, por meio do Decreto nº 51.209, de 18 de setembro de 1961, a denominação de castanha-do-Brasil, para fins de comercialização exterior (BRASIL, 1961). Entretanto, o comércio interno ainda faz uso da denominação de castanha-do-Pará para sua comercialização in natura ou quando processada.

Mesmo sendo um produto nativo da região Amazônica e amplamente produzido em território nacional, o consumo desta oleaginosa no Brasil ainda ocorre de forma reduzida (RIBEIRO et al., 1995), em virtude do alto valor de comercialização, baixa industrialização

(além do pouco investimento na cadeia de beneficiamento) e baixa incorporação em produtos já existentes. Ressalta-se que a castanha-do-Brasil ainda é matéria-prima para a indústria farmacêutica, cosmética e energética, por meio da produção de biodiesel (MENEZES; SOUZA, 2004). Além disso, a castanha-do-Brasil apresenta uma madeira de qualidade, podendo ser uma alternativa para fins de reflorestamento e a parte não comestível do ouriço é destinada para a produção de carvão vegetal.

1.2. Composição Química

Amêndoas e nozes apresentam, em geral, um elevado teor de lipídios e proteínas de alta qualidade biológica, além de possuírem um teor reduzido de sódio (FREITAS; NAVES, 2010). Esse perfil confere a sensação de saciedade aos indivíduos de ingerem alimentos pertencentes a este grupo. Estudos indicam que a ingestão de nozes e amêndoas não tem efeito significativo no aumento da massa corporal (TAN; MATTES, 2013; TAN; DHILLON; MATTES, 2014).

Estima-se que uma porção de 100 g de castanha-do-Brasil possua um valor energético de, aproximadamente, 700 kcal. A castanha-do-Brasil é amêndoa com a maior proporção entre as frações lipídica e proteica (4:1, aproximadamente), quando comparada a outras oleaginosas, tais como amendoim e castanha de caju. Sua composição centesimal ainda é um importante objeto de estudo para o desenvolvimento de pesquisas.

A Tabela 1 traz os principais valores médios da composição de macronutrientes e umidade da castanha-do-Brasil, descritos na literatura científica.

Tabela 1 – Composição de macronutrientes e umidade da Castanha-do-Brasil.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	Componentes				
	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Umidade	Fibra Bruta
BALBI et al., 2014	67,52%	14,28%	6,56%	4,35%	3,64%
MENEZES; SOUZA 2004	67,30%	14,29%	3,42%	3,13%	8,12%
VENKATACHALAM; SATHE, 2006	66,71%	13,93%	0,69%	3,07%	n/a
AGUIAR, 1996	63,87%	20,73%	9,83%	1,87%	n/a
COSTA et al., 2017	66,60%	14,87%	7,28%	n/a	7,28%
FELBERG et al., 2009	70,62%	14,35%	11,61%	n/a	2,45%
FERREIRA et al., 2006	61,00%	15,60%	17,12%	3,15%	7,79%
TACO, 2011	63,50%	14,50%	15,10%	3,50%	7,90%
USDA, 2016.	67,10%	14,32%	11,74%	3,42%	7,50%

A castanha-do-Brasil é uma reconhecida fonte de sais minerais, tais como cálcio, ferro, manganês, fósforo, magnésio, potássio, zinco e, em especial, selênio, importante mineral associado ao metabolismo de processos regulatórios. A Tabela 02 traz as informações presentes na literatura, referentes a quantidade minerais na castanha-do-Brasil.

Tabela 2 – Ocorrência de minerais na castanha-do-Brasil.

REFERÊNCIA	Minerais (mg/100 g de castanha-do-Brasil)							
	Cálcio	Magnésio	Sódio	Potássio	Zinco	Fósforo	Selênio	Ferro
SEGURA et al., 2006	248,00	275,00	1,00	728,00	n/a	n/a	n/a	n/a
TACO, 2011	146,00	365,00	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
USDA, 2016	160,00	376,00	3,00	659,00	4,06	725,00	n/a	2,43
MENEZES; SOUZA, 2004	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,20	n/a
NAOZUKA et al., 2011	182,50	309,60	n/a	507,00	3,90	n/a	n/a	3,00
YANG, 2009	743,20	967,50	n/a	n/a	11,31	n/a	3,61	7,43
WELNA; KLIMPEL; ZYRNICKI, 2008	163,00	332,10	n/a	n/a	4,30	716,40	1,00	5,58

As concentrações de macronutrientes, bem como de minerais, podem sofrer alterações devido a disposição de nutrientes no solo, condições climáticas e meteorológicas, época de floração e coleta. Estudos indicam que a forma de armazenamento e beneficiamento também podem acarretar em alterações no perfil de macronutrientes.

CHANG et al. (1995) comparou a quantidade de selênio presente em amostras de castanha-do-Brasil oriundas de diferentes regiões do território brasileiro (Acre – Rondônia e Manaus – Belém). Foram analisadas 162 unidades de castanha-do-Brasil de cada região. As amostras coletadas na região Acre – Rondônia apresentaram um teor de selênio de $3,06 \pm 4,01$ ppm, enquanto as castanhas da região Manaus – Belém apresentaram $36,0 \pm 50,0$ ppm.

Outro fator de grande impacto na composição de macro e micronutrientes da castanha-do-Brasil é a idade das amêndoas. BOUVIE et al. (2016) detectaram diferença no teor de minerais em exemplares de castanha com idades diferentes. Foi observado $3,20$ g/kg de cálcio em exemplares com maior idade, enquanto as amêndoas mais novas apresentaram um teor de cálcio igual a $2,50$ g/kg.

Estudos indicam que as variações na composição de amêndoas de uma mesma espécie podem correr em função do período de dispersão e o local de origem da planta mãe, uma vez que é a responsável em fornecer ao embrião inibidores de natureza química e física para que a germinação não ocorra no período de desenvolvimento embrionário. Além disso, a concentração de minerais está associada diretamente com o desenvolvimento do ouriço e, por consequência, o número de sementes a ser gerado por cápsula. Desta forma, há a síntese de diversas substâncias de natureza química e, por conseguinte, o armazenamento nas sementes (amêndoas), a fim de assegurar que o próximo ciclo de vida da planta, ocasionando uma composição centesimal e um perfil de minerais amplamente variado, conforme observado nos estudos supracitados (BOUVIE et al., 2016).

A interação da castanheira com o meio ambiente, bem como a utilização de nutrientes disponíveis, se dá em função das condições ambientais e a sua adaptação para com os fatores externos substanciais (SREENIVASULU; WOBUS, 2013; BOUVIE et al., 2016).

1.3. Qualidade nutricional das frações lipídica e proteica da castanha-do-Brasil

A castanha-do-Brasil é uma inegável fonte de proteínas e lipídios de alta qualidade biológica, sendo essa uma característica comum de nozes e amêndoas em geral. A composição

lipídica da castanha-do-Brasil é constituída, aproximadamente, por 15% de ácidos graxos saturados (SFA), 25% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e 21% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), em 100 g de castanha-do-Brasil. Dentre as oleaginosas, os ácidos graxos poli-insaturados encontram-se em maiores quantidades apenas nas nozeiras, pinho e amendoim. Destaca-se o enquadramento deste alimento como fonte expressiva de ômega-6 e ômega-9, além de apresentar níveis significativos de ômega-3, aproximadamente 7% do teor total de lipídios (YANG, 2009).

Os ácidos graxos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) são os que se apresentam em maior quantidade no conteúdo de ácidos graxos saturados presentes na castanha-do-Brasil, além de estarem presentes em maior quantidade quando comparados também a outras oleaginosas (YANG, 2009; USDA, 2016). Os ácidos graxos insaturados são representados, em especial, pelos ácidos oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (18:3) (TAN; MAN, 2002). A Tabela 3 contém as informações presentes na literatura, em relação ao perfil lipídico da castanha-do-Brasil.

Tabela 3 – Ocorrência de ácidos graxos saturados e insaturados em castanha-do-Brasil.

REFERÊNCIA	Componentes (g/100 g de castanha-do-Brasil* ou g/100g da fração lipídica da castanha-do-Brasil)																			
	Saturados	Mono-insaturado	Poli-insaturado	C6:0	C10:0	C11:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0	C24:0	C16:1	C18:1	C20:1	C22:1	C18:2	C18:3
VENKATACHALAM; SATHE, 2006	25,35*	29,04	45,61	0,14	0,05	0,11	n/a	0,05	15,11	0,08	9,51	0,25	0,06	n/a	0,29	28,75	n/a	n/a	45,43	0,18
RYAN et al., 2006	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,06	13,5	0,22	11,77	0,54	0,12	n/a	0,33	29,09	0,21	0,34	42,8	0,2
COLPO et al., 2014	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,07	16,74	0,14	9,97	0,17	n/a	n/a	0,43	28,52	0,09	n/a	36,04	0,11
COSTA et al.; 2011	13,16	10,61	75,34	n/a	n/a	n/a	0,06	n/a	0,05	12,89	0,06	n/a	0,24	0,04	n/a	10,46	n/a	0,31	28,73	46,61
SILVA; ASCHERI; SOUZA, 2012	25,51	74,49	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	13,33	n/a	10,78	1,4	n/a	n/a	n/a	36,21	n/a	n/a	38,28	n/a
CHUNHIENG et al., 2008.	24,4	75,6	n/a	n/a	n/a	0,2	0,2	13	n/a	11	n/a	n/a	n/a	n/a	0,2	39,3	n/a	n/a	36,1	n/a
TACO, 2011	15,3*	27,4*	21*	n/a	n/a	n/a	n/a	0,04*	0,04*	n/a	6,14*	0,16*	0,03*	n/a						
USDA, 2016.	16,134*	23,879*	24,399*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

A presença de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados em maiores proporções é um fator benéfico para o organismo humano, uma vez que a presença de ácidos graxos insaturados favorece a redução do percentual das lipoproteínas de baixa densidade e muita baixa densidade (LDL e VLDL). Falhas no mecanismo de *feed back* do colesterol podem ocasionar a elevação do seu nível sérico. Devido ao baixo peso molecular, o carreamento de compostos pelas moléculas de LDL e VLDL é dificultoso, podendo acarretar em seu acúmulo no interior dos vasos sanguíneos.

JENKINS et al. (2002) estudaram o perfil lipídico sérico em indivíduos portadores de hiperlipidemia, quando submetidos a uma ingestão diária de 37 g e 73 g de amêndoas por 30 dias. Observou-se uma redução dos níveis de lipídios no sangue, sendo mais expressivo nos indivíduos submetidos a dieta com maior quantidade de amêndoas. Verificou-se também a redução significativa dos níveis de LDL e sua forma oxidada, além da redução da razão LDL/HDL. Desta forma, é possível constatar o efeito benéfico da inclusão deste alimento na dieta contemporânea.

A qualidade e a quantidade de proteína contida na castanha-do-Brasil fizeram com que o fisiologista italiano Filippo Botazzi, no início do século XX, a denominasse de “carne vegetal” (PACHECO; SCUSSEL, 2006). A qualidade da fração proteica da castanha-do-Brasil é traduzida pela biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais presentes em sua composição. A Tabela 4 traz as informações sobre a ocorrência de aminoácidos essenciais e não-essenciais na castanha-do-Brasil.

Silva, Ascheri e Souza (2010) verificaram que a qualidade do beneficiamento, bem como o armazenamento, da castanha-do-Brasil afeta diretamente o perfil de aminoácidos essenciais presentes neste alimento, além de acarretar em uma perda de até 50% da quantidade de determinados aminoácidos essenciais, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 4 – Ocorrência de aminoácidos essenciais e não-essenciais na castanha-do-Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Componentes (g/100 g de proteína ou mg/g de nitrogênio total*)																	
	Aminoácidos essenciais									Aminoácidos não-essenciais								
	His	Ile	Leu	Lys	Met	Cys	Phe	Tyr	Thr	Trp	Val	Asp	Glu	Ala	Arg	Gly	Pro	Ser
VENKATACHALAM; SATHE, 2006	2,92	3,21	7,89	2,95	8,98	0,75	4,06	2,47	2,27	0,71	4,71	7,69	20,26	4,30	12,91	4,75	5,21	4,00
MENEZES; SOUZA, 2004	3,11	3,09	8,58	4,53	7,12	2,33	4,90	3,23	3,02	1,10	4,32	10,11	25,01	4,32	17,30	5,72	4,76	5,24
FAO, 1970	144*	175*	431*	175*	363*	131*	244*	169*	163*	119*	269*	463*	1163*	219*	831*	275*	300*	269*

Tabela 5 – Perda de aminoácidos devido ao beneficiamento da castanha-do-Brasil.

	Aminoácidos essenciais (mg/100 g de castanha-do-Brasil)									Aminoácidos totais (mg/100 g de castanha-do-Brasil)
	Ile	Leu	Lys	Met	Cys	Thr	Trp	Val		
Amêndoas intactas	2,91	8,98	3,99	6,95	1,99	2,93	2,96	4,99		35,70
Amêndoas com danos mecânicos	2,01	7,03	1,99	5,50	1,01	2,02	2,11	3,99		25,66
Percentual de perda (%)	30,93	21,71	50,12	20,86	49,25	31,06	28,72	20,04		28,12

Fonte: Adaptado de SILVA; ASCHERI; SOUZA (2010).

1.4. Mercado

O impacto da exploração da castanheira-do-Brasil para a economia da região Amazônica passou a ser expressivo entre os anos de 1920 e 1930, em virtude da queda da produção de borracha, uma vez que os seringais asiáticos passaram a fornecer um produto com valores mais competitivo, reduzindo a demanda internacional da borracha extraída da Floresta Amazônica. Desta forma, a população dessa região, bem como migrantes oriundos da região Nordeste, passaram a aplicar técnicas de extrativismo, a fim de intensificar a coleta, o beneficiamento e a comercialização desta espécie vegetal (ROSENGARTEN, 1984; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A castanha-do-Brasil é um dos principais produtos florestais não madeireiros da Amazônia (ocupando o terceiro lugar, após açaí e babaçu). Destaca-se também que, a produção de castanha-do-Brasil apresenta baixa variação entre os anos, além de possuir um alto índice anual de frutificação (KLUCZKOVSKI; LIMA; OLIVEIRA, 2016). Estima-se que no ano de 2015, a produção nacional de castanha-do-Brasil tenha sido de 40.643 toneladas, gerando uma receita de 107,40 milhões de reais (IBGE, 2015).

Entretanto, os números supracitados podem ser ainda maiores, uma vez que nem toda a produção de castanha é mapeada. Segundo a IMAFLORA, cerca de 42% dos agentes relacionados à cadeia produtiva da castanha (indústrias de transformação, atacadistas e distribuidores e varejistas) não apresentam produção mapeada (IMAFLORA, 2016).

Mesmo apresentando a maior área de ocorrência de castanheiras, o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial na produção de castanha. Hoje, a produção brasileira representa 36%, enquanto a Bolívia possui 42% da produção mundial. Até o ano de 1998, o Brasil era o líder na obtenção da oleaginosa. A mudança no ranking pode ser justificada pela redução dos castanhais produtivos, baixo investimento na melhoria da cadeia produtiva, falta de infraestrutura na logística de distribuição, transporte e armazenamento, além da dificuldade de atender às exigências fitossanitárias para a exportação (IMAFLORA, 2016).

No âmbito nacional, o estado do Acre é atualmente o maior produtor de castanhas, possuindo aproximadamente 36% do volume da produção brasileira. Amazonas e Pará ocupam o segundo e terceiro lugares, respectivamente. Os três estados detêm cerca de 89% de toda a produção. Porém, em relação ao beneficiamento, o estado do Pará é responsável por fornecer 60% da castanha destinada ao mercado interno e externo (IMAFLORA, 2016). O preço do valor da castanha-do-Brasil é impactado diretamente pelas operações envolvidas na cadeia de beneficiamento da oleaginosa, apresentando valor final entre 80 e 160 reais por quilo, em média. Entretanto, considerando a castanha oriunda do Estado do Acre antes de ser processada, a castanha com casca apresenta valor máximo de 50 reais por lata (medida tradicional utilizada pelos coletadores, que equivale a uma faixa de 10 a 13 quilos). Desta forma, utilizando a castanha não processada, o valor por quilo da matéria prima varia entre R\$ 8,00 e R\$ 12,50, aproximadamente (considerando um rendimento entre 40% e 50%), tornando esta forma da noz financeiramente mais viável para o desenvolvimento de produtos (DONA CASTANHA. 2018; EMPÓRIO BENDITO GRÃO, 2018; ESTAÇÃO DOS GRÃOS, 2018; ZONA CEREALISTA ONLINE, 2018).

2. ALIMENTOS FUNCIONAIS

2.1. Aspectos Gerais

Os padrões da vida moderna influenciam diretamente os hábitos de consumo de alimentos, destacando a alta ingestão de alimentos industrializados. Entretanto, esta tendência de alimentação é acompanhada pelo aumento da consciência do consumidor em incluir em suas dietas alimentos que possam propiciar uma melhor qualidade de vida, aliada a prática de hábitos saudáveis (KÜSTER-BOLUDA; VIDAL-CAPILLA, 2017). Os alimentos funcionais destacam-se por oferecer benefícios à saúde física e mental dos indivíduos que os ingere, além de suprir as necessidades nutricionais. Sua apresentação é dada na forma de alimentos comuns, porém, comercialmente, são utilizadas estratégias, a fim de elucidar tais características, destacando os benefícios ocasionados por sua ingestão (ARIHARA, 2014).

A denominação de alimentos funcionais surgiu no Japão, em meados dos anos 80. Esta terminologia passou a ser aplicada para alimentos que apresentavam potencial para a prevenção e redução da incidência de casos de doenças crônico-degenerativas e influência sobre vias metabólicas e fisiológicas do organismo humano (ARIHARA, 2014). Um alimento dito funcional deve obedecer a critérios, tais como: exercer ou favorecer ações e respostas fisiológicas ou metabólicas, de naturezas diversas, ser utilizado no tratamento de doenças e enfermidades e acarretar em efeitos benéficos ao organismo, quando administrado em doses não-tóxicas (RODRÍGUEZ, MEGÍAS; BAENA, 2003). Ressalta-se que os efeitos ocasionados pela ingestão desses alimentos têm por finalidade a promoção da saúde, excetuando a cura de doenças (HASLER, 1998).

Os efeitos protetores, promotores e preventivos dos alimentos funcionais se dão em virtude da presença de componentes ativos e/ou micro-organismos benéficos, que podem estar presentes naturalmente nos alimentos, sendo inerentes à sua composição, ou podem ser adicionados intencionalmente durante do processamento, podendo ser de origem vegetal ou animal. Sua formação é decorrente do ambiente e das suas condições (disposição de nutrientes, fatores climáticos e meteorológicos, forma de manejo) (GIMÉNEZ-BASTIDA; ZIELINSKI, 2015). Os componentes e micro-organismos com potencial funcional podem ser divididos em classes, que podem variar, de acordo com a legislação vigente em cada país. O Quadro 1 traz as alegações de propriedade funcional para alimentos de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Quadro 1 – Benefícios ocasionados pela ingestão de *Lactobacillus casei*.

CLASSES DE COMPONENTES	COMPOSTOS E MICRO-ORGANISMOS PERTENCENTES
Ácidos graxos EPA e DHA	Ácidos graxos EPA e DHA
Carotenóides Licopeno, Luteína e Zeaxantina	Carotenóides Licopeno, Luteína e Zeaxantina
Fibras alimentares	Fibras alimentares
Beta glucana, Dextrina resistente, Frutooligossacarídeos,	Beta glucana, Dextrina resistente, Frutooligossacarídeos,
Goma guar parcialmente hidrolisada, Inulina, Lactoluse,	Goma guar parcialmente hidrolisada, Inulina, Lactoluse,
Polidextrose, Psillium, Quitosana e Fitoesteróis	Polidextrose, Psillium, Quitosana e Fitoesteróis

Fonte: Adaptado de BRASIL (2016).

O atual perfil da alimentação humana impacta ainda na economia mundial. Estima-se que, no ano de 2017, o segmento de alimentos funcionais movimentou US\$ 300 bilhões em todo o mundo, onde 17% deste valor é correspondente à América Latina. O Brasil destaca-se como líder do mercado de alimentos e bebidas funcionais dentre os países latino americanos, uma vez que movimentou US\$ 14,6 bilhões referentes a este segmento neste mesmo ano. Projeta-se que, no ano de 2020, o volume de vendas mundial atinja US\$ 440 bilhões, representando um crescimento de, aproximadamente, 32%, quando comparado ao ano de 2017 (SANTOS et al., 2014; STATISTA, 2018). Dentre os alimentos funcionais presentes no mercado atualmente, destacam-se os alimentos contendo prebióticos e os probióticos, de forma isolada ou combinada (simbióticos).

2.2. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

Probióticos podem ser definidos como “*micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde ao hospedeiro*”. Tal definição foi elaborada em 2002 pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e apoiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), podendo ser encontrada no documento *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. A fim de complementar a definição estabelecida pela FAO/OMS, alguns pesquisadores estabeleceram alguns pontos importantes para que um micro-organismo seja dado como probiótico: apresentam resistência às condições gastrointestinais, capacidade de adesão e reduzem a adesão de microrganismos patogênicos aos epitélios do trato gastrointestinal, em especial, a mucosa intestinal (HILL et al., 2014; KOLÁČEK et al., 2017).

Durante muitos anos, apenas algumas bactérias ácido lácticas (LAB) eram dadas como probióticas, em especial, LAB pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Entretanto, no ano de 2014, um grupo de especialistas sugeriu a inclusão, junto a definição de probióticos da FAO/OMS, de espécies microbianas que apresentem estudos adequadamente controlados e que tenham sido constatados benefícios à saúde, como leveduras pertencentes ao gênero *Sacharomyces*. Este mesmo grupo também indicou que a utilização da expressão “contém probióticos” deve apresentar comprovação científica (HILL et al., 2014).

O Quadro 2 traz os efeitos já confirmados pela ingestão adequada de probióticos, os dividindo em três classes propostas por Hill e colaboradores (2014): Raros, Frequentes e Difundidos.

Quadro 2 – Efeitos benéficos ocasionados pela ingestão de probióticos.

CLASSE	EFEITOS
RAROS*	<ul style="list-style-type: none"> • Efeitos neurológicos; • Efeitos imunológicos; • Efeitos endocrinológicos; • Produção de bioativos específicos.
FREQUENTES**	<ul style="list-style-type: none"> • Síntese de vitaminas; • Antagonismo direto; • Reforço de barreira intestinal; • Metabolismo do sal biliar; • Atividade enzimática; • Neutralização de substâncias cancerígenas.

DIFUNDIDOS***	<ul style="list-style-type: none"> • Resistência à colonização; • Produção de ácidos e ácidos graxos de cadeia curta; • Regulação do trânsito intestinal; • Normalização da microbiota perturbada; • Maior rotatividade de enterócitos; • Exclusão competitiva de patógenos.
----------------------	--

* *Efeitos específicos relacionados às determinadas cepas*; ** *Efeitos relacionados à espécie*; *** *Gerais em probióticos estudados*.

Inicialmente, os prebióticos eram definidos como ingredientes alimentares não digeríveis com a capacidade de afetar de forma benéfica o metabolismo do hospedeiro, por meio do estímulo, de forma seletiva, de um grupo específico de bactérias na região do cólon, favorecendo seu crescimento e atividade (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Tal definição foi discutida primeiramente em 1995 e permaneceu imutável por muitos anos. Em 2008, o conceito de prebiótico passou por modificações, sendo definido como “*um ingrediente seletivamente fermentado que resulta em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefício (s) à saúde do hospedeiro*” (GIBSON et al., 2010). A partir do novo conceito, assumiu-se que os benefícios gerados pela ingestão de prebióticos não estaria limitada apenas a região do cólon, podendo observar melhorias na cavidade oral, trato urogenital, pele, entre outros. Bindels e colaboradores (2015) propuseram uma definição mais ampla para os prebióticos: “*compostos não digeríveis que, quando metabolizados por micro-organismos no intestino, modula a composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo algum efeito benéfico ao hospedeiro*”.

Por muito tempo, os prebióticos foram representados majoritariamente por carboidratos, em especial os oligossacarídeos (galactooligosacarídeo – GOS e frutooligosacarídeo – FOS) e inulina. A inulina é uma fibra solúvel em água, extraída principalmente da raiz da chicória (NINESS, 1999). Em relação a solubilidade, a inulina é menos solúvel que a FOS, visto que a inulina é formada por cadeias longas, podendo formar microcristais em água e leite, promovendo a formação de uma mistura com aspecto cremoso (FRANCK, 2002). Em virtude deste atributo tecnológico, a inulina apresenta-se como um potencial substituto de gordura, por conferir melhora na consistência e textura, sem alterar o sabor (COUSSEMENT, 1999; ROBERFROID, 2005).

Com a atualização no conceito de prebióticos, a lista de compostos pertencentes a este grupo também foi atualizada, passando a incluir amidos resistentes, pectina, arabinóxilano, grãos integrais e compostos não-carboidratos, como polifenóis e ácidos graxos poli-insaturados (GIBSON et al., 2017).

Benefícios ao trato gastrointestinal (inibição de patógenos, estimulação imunológica), cardiometabolismo (redução nos níveis de lipídios no sangue, efeitos sobre a resistência da insulina), saúde mental (metabólitos que influenciam a função cerebral, energia e cognição) e saúde óssea (por exemplo, biodisponibilidade mineral) são alguns dos efeitos positivos acarretados pela ingestão de prebióticos (GIBSON et al., 2017).

Destaca-se ainda a associação dos probióticos e prebióticos. Tal junção é explicitada na formação de alimentos simbióticos, que tem por objetivo explorar, de maneira simultânea e sinérgica, os efeitos benéficos ocasionados pela ingestão de probióticos e prebióticos, potencializando a ação e o metabolismo dos micro-organismos ingeridos e da microbiota já existente (OLIVEIRA; GONZÁLEZ-MOLERO, 2007).

2.3. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei é uma LAB, classificada como gram-positiva, não motil, não esporulada e catalase-negativa. Suas células têm formato de bastão, podendo se apresentar de forma individual, em pares ou em cadeia. As espécies deste grupo podem ser isoladas de diferentes matrizes: leite, produtos lácteos, salsichas, legumes, vinho e massa lêmada. Além dos alimentos, o trato gastrointestinal e as fezes também podem ser fonte de cepas de *Lactobacillus*. Outra característica destacável deste grupo é sua resistência a valores baixos de pH. Para seu metabolismo, são necessários alguns nutrientes, tais como: Riboflavina, ácido fólico, pantotenato de cálcio, niacina e piridoxal ou piridoxamina, sendo este último composto essencial para o desenvolvimento de algumas cepas. A contagem de *L. casei* é feita pela utilização do meio de cultura de Man, Rogosa e Sharpe (MRS). Sua temperatura ótima de crescimento é 37 °C, porém, na literatura científica há diversos trabalhos que utilizam temperaturas superiores e inferiores à ótima, em especial, utilizando valores na faixa de 15 a 42 °C. Este micro-organismo é anaeróbico e apresenta metabolismo heterofermentativo, tendo como principais metabólitos os ácidos acético e láctico. Por se tratar de um grupo notavelmente adaptável, o *Lactobacillus casei* é amplamente utilizado na indústria alimentícia, sendo aplicado com destaque nos processos de fermentação de leite, para a obtenção dos leites fermentados e como culturas de aceleração e intensificação no desenvolvimento de características sensoriais de alguns tipos de queijo (GOBBETI; MINERVINI, 2014).

Mesmo sendo aplicado há tanto tempo na indústria alimentícia, o *Lactobacillus casei* ainda continua sendo objeto de estudos, devido aos efeitos benéficos exercidos sobre o hospedeiro. O Quadro 3 traz alguns benefícios já elucidados na literatura científica.

Quadro 3 – Benefícios ocasionados pela ingestão de *Lactobacillus casei*.

BENEFÍCIO	REFERÊNCIA
Melhorias dos sintomas de osteoporose	KIM et al., 2009.
Efeitos positivos na redução do movimento intestinal e melhorias na função renal e contra inflamações	AKOGLU et al., 2015.
Efeito de hipocolesterolemia	GUO; LI, 2013.
Redução das chances de desenvolvimento de diabetes	YADAV; JAIN; SINHA, 2007.
Melhoria da saúde bucal e dentária	SUTULA et al., 2013.
Melhoria no tratamento da erradicação de <i>H. pylori</i> em crianças com gastrite	SÝKORA et al., 2005.
Melhoria no perfil lipídico e hematológico em mulheres com sobrepeso e hipertensas	ALBERDA et al., 2018.
Redução de adesão do rotavírus em células	FERNANDEZ-DUARTE et al., 2018.
Auxílio no tratamento da remissão da diverticulite	TURSE et al., 2013.
Contribuição na perda de peso de crianças obesas e melhoria no metabolismo de lipídios	NAGATA et al., 2017.

Embora o *Lactobacillus casei* possa ser isolado de diversas fontes, as LABs em geral são utilizadas para a elaboração de produtos lácteos. Desta forma, os benefícios ocasionados por este grupo de micro-organismos ficam restritos aos consumidores que não apresentem impedimento ao consumo de leite.

Diante do exposto, o desenvolvimento de produtos utilizando o *Lactobacillus casei* atende a importantes nichos de mercado e pesquisa, a serem explorados e estudados, a fim de promover benefícios à saúde de indivíduos que apresentem restrições ideológicas e/ou alimentares, como veganismo, vegetarianismo, intolerância à lactose e alergia às proteínas do leite.

3. “LEITES VEGETAIS”

3.1. Aspectos Gerais

A denominação “leite vegetal” é dada a bebidas elaboradas a partir de extratos obtidos de grãos, cereais, sementes, tubérculos, oleaginosas e frutas. Tecnicamente, esta terminologia não é adequada. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define leite como o produto obtido da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias, devidamente alimentadas e em condições físicas adequadas, além de dispor das devidas condições de higiene. Caso o produto seja obtido de outros animais, a denominação deverá conter a palavra leite, seguida do nome da espécie do animal (BRASIL, 2011). A ANVISA, através da RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000, proíbe a utilização do termo “leite de soja”. Entretanto, a RDC nº 83, do mesmo órgão e ano, permite a utilização da terminologia leite de coco (BRASIL, 2000). Desta forma, observa-se inconsistências na legislação brasileira para a denominação destes produtos. Revistas de grande impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos também fazem uso da expressão “vegetable milk”, que pode ser traduzida como “leite vegetal”, para denominar bebidas de origem vegetal dadas como substituintes do leite e derivados (BERNAT et al., 2014; ABOULFAZLI; BABA, 2015; ABOULFAZLI; BABA; MISRAN, 2015; PINELI et al., 2015; OLAOYE, 2015; ABOULFAZLI; BABA; MISRAN, 2016; ABOULFAZLI; SHORI; BABA, 2016; KPODO et al., 2016; MANG et al., 2016; NAZARI et al., 2017).

Os “leites vegetais” são uma tendência de mercado e de consumo em todo mundo, por meio de produtos industrializados ou ainda, por elaborações feitas de forma artesanal ou doméstica. Tal denominação ocorre devido à similaridade visual de alguns extratos vegetais com o leite de vaca, além de serem dados como substitutos do leite de vaca e de outros animais, podendo ser consumidos puros, combinados com frutas, saborizados ou incorporados em preparações alimentícias (FELBERG et al., 2004). A substituição do leite por tais bebidas se dá em virtude aos crescentes casos de restrições alimentares, ocasionados por alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) e intolerantes à lactose (carboidrato presente no leite e derivados) e regimes alimentares e/ou ideológicos (diferentes vertentes do vegetarianismo) (MÄKINENA et al., 2015).

3.2. Intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite, vegetarianismo e veganismo

As alergias, de modo geral, podem ser definidas como uma reação adversa do organismo não tóxica, sendo essa uma resposta mediada pelo sistema imunológico. Sua definição encontra-se de forma análoga à definição de hipersensibilidade a um dado composto (FALCÃO; MANSILHA, 2017). A alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) ocorre devido a uma resposta imune específica, uma vez que o indivíduo é exposto, principalmente, a fração proteica composta por caseína e pelas proteínas do soro – β -lactoglobulina (Figura 1), presente em concentrações baixíssimas no leite materno, e α -lactoalbumina (Figura 2) (HOCHWALLNER et al., 2014).

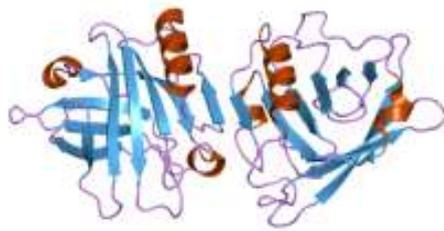


Figura 1 – Molécula de β -lactoglobulina.

Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/>. Acessado em 22 de janeiro de 2019.

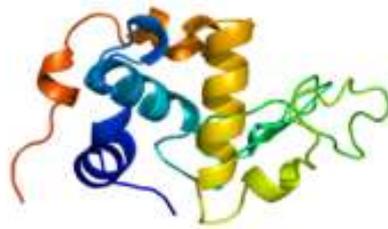


Figura 2 – Molécula de α -lactoalbumina.

Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/>. Acessado em 22 de janeiro de 2019.

A APLV pode ou não ser mediada pela Imunoglobulina E (IgE), importante anticorpo presente no sangue. Quando a APLV é desencadeada pela ação da IgE, temos uma hipersensibilidade do tipo I. Em casos que a IgE não é a desencadeadora da APLV, a hipersensibilidade é caracterizada como III ou IV. Além disso, a APLV pode ocorrer de forma simultânea, ou seja, apresentando as hipersensibilidades I, III e IV de forma conjunta (LYRA et al., 2013) O leite de vaca faz parte do grupo dos oito alimentos alérgicos de maior expressividade, sendo acompanhado pelo ovo, soja, trigo, amendoim, frutos secos, peixe e marisco e se apresenta como o maior alergênico para crianças menores de 3 anos (WILSON; BLASCHEK; MEJIA, 2005). A APLV pode se manifestar de formas diversas, sendo observada interações entre os sistemas, em especial, os sistemas gastrointestinal e respiratório. Destaca-se as seguintes manifestações da APLV em humanos: regurgitação, vômitos, cólicas, dor abdominal, perda de epitélio intestinal, sangue em fezes, tosse crônica, dificuldade respiratória, urticária e eczemas (KOLETZKO et al., 2012).

Ao contrário da APLV, a intolerância à lactose (IAL) não tem relação com o sistema imunológico. Conforme supracitado, a lactose (Figura 3) é um importante carboidrato presente no leite.

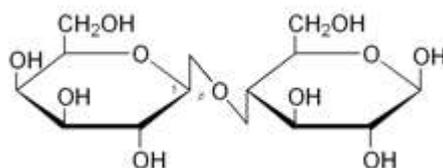


Figura 3 – Molécula de Lactose.

Fonte: <https://www.infoescola.com/bioquimica/lactose/>

Além de atuar como fonte energética, a lactose é capaz de facilitar a absorção de micronutrientes. Para que a lactose absorvida, é necessária sua hidrólise em glicose e galactose,

sendo este um processo enzimático, executado pela ação da lactase, enzima classificada como hidrolase, presente nas vilosidades do epitélio intestinal (HEYMAN, 2006). A IAL se manifesta de forma mais branda que a APLV, uma vez que não se observa perda de epitélio intestinal. As principais formas de manifestação da IAL são: diarreia, flatulência, náuseas, enjoo e dor abdominal. Tais sintomas ocorrem decorrente a exposição à lactose (FALCÃO; MANSILHA, 2017). Existem 3 níveis de IAL. A IAL primária ocorre devido ao declínio natural da síntese de lactase. Nos primeiros anos de vida, o organismo produz uma grande quantidade desta enzima, visto que, a dieta neste período é rica em alimentos fontes de lactose. Ao decorrer dos anos, com a inserção de novos alimentos na dieta, o organismo é estimulado a produzir uma menor quantidade de lactase, promovendo um declínio natural de sua concentração, podendo levar a um quadro de intolerância ao carboidrato. Já a IAL secundária é decorrente da redução da produção de lactase por injúrias ao epitélio intestinal, em virtude de procedimentos cirúrgicos, casos clínicos e doenças, tais como gastroenterite, doença celíaca e doença de Crohn. Por fim, a IAL congênita é observada de forma discreta. Ocorre quando bebês nascem com uma deficiência total na síntese de lactase, sendo caracterizado como um quadro de herança autossômica recessiva (CANANI et al., 2016).

Estimam-se que 33% da população mundial seja intolerante à lactose (STATISTIC BRAIN, 2017). Entre 2% e 3% da população mundial de crianças é alérgica às proteínas do leite (KOLETZKO et al., 2012).

Os regimes alimentares e/ou ideológicos são representados pelas diversas formas de vegetarianismo. De acordo com a Sociedade Brasileira de Vegetarianismo (SVB), o vegetarianismo é dado como o regime alimentar onde há a exclusão total do consumo de qualquer tipo de carne. A partir deste princípio, há classificações subsequentes: ovolactovegetarianismo – indivíduos fazem a ingestão de ovos, leite e derivados; lactovegetarianismo – indivíduos que ingerem de leite e derivados; ovovegetarianismo – indivíduos que fazem uso de ovos em sua alimentação; vegetarianismo estrito – indivíduos que não fazem uso de nenhum produto de origem animal em sua alimentação. Além das vertentes citadas, os indivíduos adeptos do regime ideológico do veganismo são caracterizados por não fazer uso de nenhum produto (alimentar ou não), obtido através da exploração e/ou sofrimento de animais (SVB, 2014). Entretanto, alguns estudiosos propõem outra vertente do vegetarianismo, não caracterizada pela SVB. O semivegetarianismo ou flexitarianismo é representado por indivíduos que realizam a ingestão de determinados tipos de carnes (aves e peixes) de forma reduzida e esporádica (FERREIRA; BURINI; MAIA, 2006; CHIBA et al., 2010). Não há estatísticas precisas sobre o número de vegetarianos no Brasil e no mundo.

3.3. “Leites vegetais” fermentados

A fim de atender as demandas de consumo, a indústria e a ciência vêm trabalhando na pesquisa e desenvolvimento de produtos diferenciados tendo como base matrizes vegetais. Para os “leites vegetais” convencionais, podemos observar valores de comercialização com variação entre R\$2,99/L e R\$30,07/L em janeiro de 2019. As opções fermentadas apresentam-se em um número reduzido de variedade de produtos e com valores praticados na faixa de R\$ 2,49/180 mL a R\$ 9,50/110 mL no período supracitado. Em geral, os produtos vegetais fermentados apresentam-se saborizados com frutas e outros ingredientes, como chocolate, baunilha e hibisco. As bases mais utilizadas são soja, castanha de caju, coco e amêndoa. As Figuras 4, 5, 6 e 7 trazem algumas marcas e produtos destinados ao nicho mercadológico de vegetarianos, veganos, intolerantes à lactose e/ou alérgicos às proteínas do leite.



Figura 4 – Bebidas da marca Vida veg®.

Fonte: <https://boaforma.abril.com.br/nutricao/marcas-de-iogurte-vegano-para-quem-nao-consome-produtos-de-origem-anim/>



Figura 5 – Bebida da marca Nogurt®.

Fonte: <https://boaforma.abril.com.br/nutricao/marcas-de-iogurte-vegano-para-quem-nao-consome-produtos-de-origem-anim/>



Figura 6 – Bebidas das marcas Fresco® e Batavo®.

Fonte: <https://boaforma.abril.com.br/nutricao/marcas-de-iogurte-vegano-para-quem-nao-consome-produtos-de-origem-anim/>

No tocante científico, são variadas as opções de matérias-primas utilizadas pela elaboração de bebidas fermentadas isentas de componentes de origem animal. Ressalta-se que os estudos indicam a alegação funcional das bebidas desenvolvidas, diferentemente das opções presentes no mercado. Os micro-organismos utilizados para a fermentação também são variados. O Quadro 4 traz as matérias-primas e micro-organismos propostos pela literatura científica para a elaboração de “leites vegetais” fermentados.

Quadro 4 – Propostas de “leites vegetais” fermentados.

MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA	MICRO-ORGANISMO UTILIZADO	REFERÊNCIA
Quinoa e Soja	<i>Lactobacillus casei</i>	BIANCHI et al., 2014.
Trigo sarraceno	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MATEJČEKOVÁ et al., 2018.
Mandioca e arroz	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	FREIRE et al., 2017.
Leite de soja	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IÇIER et al., 2015
Soja, amêndoa e coco	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CHAVAN et al., 2018.
Farelo de arroz	<i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i>	ZUBAIDAH et al., 2012.
Farinha de aveia	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GUPTA; BAJAJ, 2017.

Ainda que as pesquisas apresentem diversidade nos micro-organismos e na matérias-primas utilizadas para obter “leites vegetais” fermentados, os estudos ainda ocorrem de forma discreta no que se refere na utilização de matrizes vegetais nativas. É de suma importância o estabelecimento das condições de processo, bem como das formulações para elaboração dessas bebidas no tocante científico para que os modelos possam ser aplicados na indústria, a fim de promover o acesso do consumidor a produtos diferenciados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOULFAZLI, F. A.; BABA, A. S. Effect of vegetable milk on survival of probiotics in fermented ice cream under gastrointestinal conditions. **Food Science and Technology Research**, v. 21, n. 3, p. 391-397, 2015.

ABOULFAZLI, F. A.; BABA, A. S.; MISRAN, M. Effects of fermentation by *Bifidobacterium bifidum* on the rheology and physical properties of ice cream mixes made with cow and vegetable milks. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 4, p. 942-949, 2015.

ABOULFAZLI, F. A.; BABA, A. S.; MISRAN, M. Replacement of bovine milk with vegetable milk: Effects on the survival of probiotics and rheological and physicochemical properties of frozen fermented dessert. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 1, p. 71-80, 2016.

ABOULFAZLI, F. A.; SHORI, A. B.; BABA, A. S. Effects of the replacement of cow milk with vegetable milk on probiotics and nutritional profile of fermented ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 261-270, 2016.

AGUIAR, J. P. L. Tabela de Composição de Alimentos da Amazônia. **Acta Amazônia**, v.26, n.1-2, p.121-126, 1996.

AKOGLU, B.; LOYTVED, A.; NUIDING, H.; ZEUZEM, S.; FAUST, D. Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota improves kidney function, inflammation and bowel movements in hospitalized patients with acute gastroenteritis – A prospective study. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 305-313, 2015.

ALBERDA, C.; MARCUSHAMER, S.; HEWER, T.; JOURNAULT, N.; KUTSOGIANNIS, D. Feasibility of a *Lactobacillus casei* Drink in the Intensive Care Unit for Prevention of Antibiotic Associated Diarrhea and *Clostridium difficile*. **Nutrients**, v. 10, p. 1-13, 2018.

ARIHARA, K. Functional Foods. **Encyclopedia of Meat Sciences**, v. 2, p. 32-36, 2014.

BALBI, M. E.; PENTEADO, P. T. P. da S.; CARDOSO, G.; SOBRAL, M. G.; SOUZA, V. R. de. Castanha-do-Pará (*Bertholletia Excelsa* Bonpl.): Composição Química e sua Importância para Saúde. **Visão Acadêmica**, v. 15, p. 51-63, 2014.

BAYMA, M. M. A.; MALAVAZI, F. W.; SA, C. P.; FONSECA, F. L.; ANDRADE, E. P.; WADT, L. H. O. Aspectos da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil no estado do Acre, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 9, n. 2, p. 417-426, 2014.

BERNAT, N.; CHÁFER, M.; RODRÍGUEZ-GARCIA, J.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. **LWT - Food Science and Technology**, v. xxx, p. 1-9, 2014.

BIANCHI, F.; ROSSI, E.; GOMES, R.; SIVIERI, K. Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and soy. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 6, p. 403–415, 2014.

BINDELS, L. B.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; WALTER, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303–310, 2015.

BOUVIE, L.; BORELLA, D. R.; PORTO, P. A. de O.; SILVA, A. C. da; LEONEL, S. Caracterização físico-química dos frutos de castanheira do Brasil. *Nativa*, v. 1, n. 2, p. 107-111, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC nº 83, de 15 de setembro de 2000. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Leite de Coco**. Brasília, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimento com Soja**. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -MAPA. Portaria nº 846, de 19 de novembro de 1976. **Especificações para padronização, classificação e comercialização interna da Castanha do Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.)**. Brasília, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 51.209, de 18 de agosto de 1961. **Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização da exportação da "Castanha do Brasil"**. Brasília, 1961.

CAMARGO, P. B. de; SALOMÃO, R. de P.; TRUMBORE, S.; MARTINELLI, L. A. How old are large Brazil-nut trees (*Bertholletia excelsa*) in the Amazon? *Scientia Agricola*, v. 51, n. 2, p. 389-391, 1994.

CANANI, R. B.; PEZZELLA, V.; AMOROSO, A.; COZZOLINO, T.; SCALA, C. di., PASSARIELLO, A.; Diagnosing and Treating Intolerance to Carbohydrates in Children. *Nutrients*, v. 8, n. 3, p.1-16, 2016.

CHANG, J. C.; GUTENMANN, W. H.; REID, C. M.; LISK, D. J. Selenium Content of Brazil Nuts from Two Geographic Locations in Brazil. *Chemosphere*, v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.

CHAVAN, M.; GAT, Y.; HARMALKAR, M.; WAGHMARE, R. Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. *LWT – Food Science and Technology*, v. 91, p. 339–344, 2018.

CHIBA, M.; ABE, T.; TSUDA, H.; SUGAWARA, T.; TSUDA, S.; TOZAWA, H.; FUJIWARA, K.; IMAI, H. Lifestyle-related disease in Crohn’s disease: Relapse prevention by a semi-vegetarian diet. *World Journal of Gastroenterology*, v. 19, n. 20, p. 2484-2495, 2010.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D.

COLPO, E.; VILANOVA, C. D. D. A.; REETZ, L. G. B.; DUARTE, M. M. M. F.; FARIAS, I. L. G.; MEINERZ, D. F.; MARIANO, D. O. C.; VENDRUSCULO, R. G.; BOLIGON, A. A.; CORTE, C. L. D.; WAGNER, R.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T. da. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition*, v. 30, p. 459-465, 2014.

COSTA, D. A. da; ÁLVARES, V. de S.; KUSDRA, J. F.; NOGUEIRA, R. M.; MACIEL, V. T.; MIQUELONI, D. P. Quality of in-shell Brazil nuts after drying using a pilot natural convection oven in the state of Acre, Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 1-9, 2017.

COSTA, P. A. da; BALLUS, C. A.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Fatty acids profile of pulp and nuts of brazilian fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 950-954, 2011.

COUSSEMENT, P. A. A. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n.7, p. 1412S–1417S, 1999.

DONA CASTANHA. Seção Castanha do Pará. Disponível em: <<https://www.donacastanha.com.br/nozes-e-castanhas/castanha-do-para.html>>. Acessado em 28 de outubro de 2018.

EMPÓRIO BENDITO GRÃO. Seção Nozes e Frutas. Disponível em: <<https://www.benditograo.com.br/nozes-e-frutas/castanhas-e-nozes-oleaginosas/>>. Acessado em 28 de outubro de 2018.

ESTAÇÃO DOS GRÃOS. Seção Castanhas, Nozes e Amendoas. Disponível em: <<https://www.estacaodosgraos.com.br/graos/castanhas-nozes-e-amendoas.html>>. Acessado em 28 de outubro de 2018.

FALCÃO, I.; MANSILHA, H. F. Cow's Milk Protein Allergy and Lactose Intolerance. **Acta Pediátrica Portuguesa**, n. 48, p. 53-60, 2017.

FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S. C. de; MODESTA, R. C. D. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 609-617, 2009.

FELBERG, I.; DELIZA, R.; GONÇALVES, E.B.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C.; CABRAL, L.C.; Bebida mista de extrato de soja integral e castanha do Brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 163-174, 2004.

FERNANDEZ-DUARTE, K. P.; OLAYA-GALÁN, N. N.; SALAS-CÁRDENAS, S. P.; LOPEZ-ROZO, J.; GUTIERREZ-FERNANDEZ, M. F. Bifidobacterium adolescentis (DSM 20083) and *Lactobacillus casei* (Lafti L26-DSL): Probiotics Able to Block the In Vitro Adherence of Rotavirus in MA104 Cells. **Probiotics and Antimicrobial proteins**, v. 10, p. 56–63, 2018.

FERREIRA, E. de S.; SILVEIRA, C. da S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 203–208, 2006.

FERREIRA, E. de S.; SILVEIRA, C. da S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.

FERREIRA, L. G.; BURINI, R. C.; MAIA, A. F.; Vegetarian diets and sports performance. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 469-477, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Amino-acid content of foods and biological data on proteins**. Food Policy and Food Science Service, Nutrition Division, FAO. Rome, Italy, 1970. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/AC854T/AC854T00.htm#TOC>. Acessado em 03 de outubro de 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food - Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. 11 p., 2002.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. S287-S291, 2002.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; DA COSTA SOUZA, P. N.; CARDOSO, M. G. B.; SCHWAN, R. F. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 248, p. 39–46, 2017.

FREITAS, J. B; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n.2, p. 269-279, 2010.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews – Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p.491-502, 2017.

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

GIBSON, G. R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; TUOHY, K. M.; HOTCHKISS, A.; DUBERT-FERRANDON, A.; GAREAU, M.; MURPHY, E. F.; SAULNIER, D.; LOH, G.; MACFARLANE, S.; DELZENNE, N.; RINGEL, Y.; KOZIANOWSKI, G.; DICKMANN, R.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; WALKER, C.; BUDDINGTON R. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A.; ZIELINSKI, H. Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 13, p. 7896-7913, 2015.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F. *Lactobacillus casei*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 2, p. 432–438, 2014.

GUARIGUATA, M. R.; CRONKLETON, P.; DUCHELLE, A. E.; ZUIDEMA, P. A. Revisiting the ‘cornerstone of Amazonian conservation’: a socioecological assessment of Brazil nut exploitation. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, p. 2007-2027, 2017.

GUO, C. F.; LI, J. Y. Hypocholesterolaemic action of *Lactobacillus casei* F0822 in rats fed a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 144-149, 2013.

GUPTA, M.; BAJAJ, B. K. Development of fermented oat flour beverage as a potential probiotic vehicle. **Food Bioscience**, v. 20, p. 104–109, 2017.

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention na health promotion. **Food Technology**, v. 52, n. 11, p. 63-68, 1998.

HEYMAN, M. B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. **Pediatrics**, v. 118, n. 3, p. 1279-1286, 2006.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Natural Reviews in Gastroenterology Hepatology**, v.11, p. 506–514, 2014.

HOCHWALLNER, H.; SCHULMEISTER, U.; SWOBODA, I.; SPITZAUER, S.; VALENTA, R. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. **Methods**, v. 66, n. 1, p. 22-33, 2014.

IÇIER, F.; GÜNDÜZ, G. T.; YILMAZ, B.; MEMELI, Z. Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 57-64, 2015.

IMAFLORA – INSTITUTO DE MANEJO E CERTIFICAÇÃO FLORESTAL E AGRÍCOLA. **Panorama Nacional da Cadeia de valor da castanha-do-Brasil**. 60 p., Piracicaba, São Paulo, 2016.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; MARCHIE, A.; PARKER, T. L.; CONNELLY, P. W.; QIAN, W.; HAIGHT, J. S.; FAULKNER, D.; VIDGEN, E.; LAPSLEY, K. G.; SPILLER, G. A. Doe Response of Almonds on Coronary Heart Disease Risk Factors: Blood Lipids, Oxidized Low-Density Lipoproteins, Lipoprotein(a), Homocysteine and Pulmonary Nitric Oxide: A Randomized, Controlled, Crossover Trial. **Circulation**, v. 106, p. 1327-1332, 2002.

KIM, J. G.; LEE, E.; KIM, S. H.; WHANG, K. Y.; OH, O.; I, J-Y. Effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product on bone metabolism in ovariectomised rats. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 690-695, 2009.

KLUCZKOVSKI, A.; LIMA, N.; OLIVEIRA, M. K. Brazil nut powdered milk properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.40, p. 1-6, 2016.

KOLAČEK, S.; HOJSAK, I.; CANANI, R. B.; GUARINO, A.; INDRIIO, F.; OREL, R.; POT, B.; SHAMIR, R.; SZAJEWSKA, H.; VANDENPLAS, Y.; VAN GOUDOEVEER, J.; WEIZMAN, Z. Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.65, p.117–124, 2017.

KOLETZKO, S.; NIGGEMANN, B.; ARATO, A.; DIAS, J. A.; HEUSCHKEL, R.; HUSBY, S.; MEARIN, M. L.; PAPADOPOULOU, A.; RUEMMELE, F. M.; STAIANO, A.; SCHÄPPI, M. G.; VANDENPLAS, Y. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 55, n. 2, p. 221-229, 2012.

KPODO, M. K. F.; AFOAKWA, E.; SAALIA, K.; AMOA, B. Changes in physico-chemical characteristics and volatile flavour components of different yoghurt products made from soy, peanuts and cow milk. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 16, n. 4, p. 11278-11294, 2016.

KÜSTER-BOLUDA, I.; VIDAL-CAPILLA, I. Consumer attitudes in the election of functional foods. **Spanish Journal of Marketing – ESIC**, v. 21, supl. 1, p. 65-79, 2017.

- LYRA, N. R. S.; MOTTA, M. E. F. A., ROCHA, L. A. R.; SOLÉ, D.; PEIXOTO, D. M.; RIZZO, J. A.; TABORDA-BARATA, L.; SARINHO, E. S. C. Adverse Reactions to Foods and Food Allergy: Development and Reproducibility of a Questionnaire for Clinical Diagnosis. **Journal of Allergy**, p. 1-7, 2013.
- MÄKINENA, O. E.; WANHALINNAB, V.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Foods for Special Dietary Needs: Non-Dairy Plant Based Milk Substitutes and Fermented Dairy Type Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 339-349, 2015.
- MANG, Y. D.; NJINTANG, Y. N.; ABDU, B. A.; SCHER, J.; BERNARD, C.; MBOFUNG, M. C. Dehulling reduces toxicity and improves in vivo biological value of proteins in vegetal milk derived from two mucuna (*Mucuna pruriens* L.) seeds varieties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 6, p. 2548-2557, 2016.
- MATEJČEKOVÁ, Z.; SOLTÉSZOVÁ, F.; AČAI, P.; LIPTÁKOVÁ, D.; VALÍK, L. Application of *Lactobacillus plantarum* in Functional Products Based on Fermented Buckwheat. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 1053–1062, 2018.
- MENEZES, H. C.; SOUZA, M. L. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 120-128, 2004.
- MYERS, G. P.; NEWTON, A. C.; MELGAREJO, O. The influence of canopy gap size on natural regeneration of brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in Bolivia. **Forest Ecology and Management**, v. 127, p. 199-128, 2000.
- NAGATA, S.; CHIBA, Y.; WANG, C.; YAMASHIRO, Y. The effects of the *Lactobacillus casei* strain on obesity in children: a pilot study. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 535-543, 2017.
- NAOZUKA, J.; VIEIRA, E. C.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1667-1672, 2011.
- NAZIRI, E.; KOUPANTSIS, T.; MANTZOURIDOU, F.T.; PARASKEVOPOULOU, A.; TSIMIDOU, M.Z.; KIOSSEOGLOU, V. Influence of thermal treatment on the stability of vegetable “milk” obtained by ultrafiltration of aqueous oil body extracts from various sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 7, p. 1-37, 2017.
- NINESS, K. R. Inulin and Oligofructose: What Are They? **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402S–1406S, 1999.
- OLAOYE, O. A. A study on quality parameters and shelf stability of sweetened condensed vegetable milks produced from four varieties of soybeans (*Glycine max*). **International Food Research Journal**, v. 22, n. 6, p. 2212-2218, 2015.
- OLIVEIRA, F. G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Probiotics and prebiotics in clinical practice. **Nutricion Hospitalaria**, v. 22, supl. 2, p. 26-34, 2007.
- PACHECO, A.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006.
- PINELI, L. de L. de O.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P.; SOLORZANO, J. L.; OLIVEIRA, G. T. de; REIS, C. E. G.; TEIXEIRA, D. da S. Low glycemic index and increased protein content in a novel quinoa milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1261-1267, 2015.

- REID, G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, p.17-25, 2016.
- RIBEIRO, M. A. A.; SOLER, R. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; LIMA, V. A. Shelled Brazil nuts canned under different atmospheres. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 105-107, 1995.
- ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, suppl. 2, p. s105-s110, 2002.
- RODRÍGUEZ, M. B. S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. Alimentos Funcionales y Nutrición óptima. **Revista da Espanha de Salud Pública**. v. 77, n. 3, p. 317-331, 2003.
- ROSENGARTEN, F. **The book of edible nuts**. 416 p. New York: Walker, 1984.
- RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T. P.; MAGUIRE, A. R.; O'BRIEN, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 57, n. 3/4, p. 219-228, 2006.
- SALOMÃO, R. de P.; ROSA N. A.; CASTILHO, A.; MORAIS, K. A. C. Castanheira-do-brasil recuperando áreas degradadas e provendo alimento e renda para comunidades da Amazônia Setentrional. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 1, n. 2, p. 65–78, 2006.
- SALOMÃO, R. P. Estrutura e densidade de *Bertholletia excelsa* H & B ("Castanheira") nas regiões de Carajás e Marabá, estado do Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 7: p. 47-68, 1991.
- SANTOS, F. L.; FERREIRA, M. A.; PIRES, E. A.; OLIVEIRA, F. S. de; SILVA, C. F. G. da; VIEIRA, R. B. Análise das patentes de tecnologias relacionadas aos probióticos, prebióticos e simbióticos no Brasil. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 17, n. 3, p. 252-258, 2014.
- SEGURA, R.; JAVIERRE, C.; LIZARRAGA, A.; ROS, E. Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals. **British Journal of Nutrition**, v. 96, Suppl. 2, p. S36–S44, 2006.
- SILVA, R. F. da; ASCHERI, J. L. R.; SOUZA, J. M. L. de. Influence of Brazil nut processing on the quality of nuts. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 445-450, 2010.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE VEGETARIANISMO – SVB. **Vegetarianismo – O que é?**. Outubro/2014. Disponível em: <https://www.svb.org.br/vegetarianismo1>. Acessado em 05 de novembro de 2017.
- SREENIVASULU, N.; WOBUS, U. Seed-Development Programs: A Systems Biology–Based Comparison Between Dicots and Monocots. **Annual Review Plant Biology**, v. 6, p. 189-217, 2013.
- STATISTA. **Functional foods market in the U.S. – Statista dossier on the functional foods market in the U.S.** 76 p., New York, USA: Statista Inc., 2018.
- STATISTIC BRAIN. **Lactose Intolerance Statistics**. 2017. Disponível em: <https://www.statisticbrain.com/lactose-intolerance-statistics/>. Acessado em: 05 de novembro de 2017.

SUTULA, J.; COULTHWAITE, L. A.; THOMAS, L. V.; VERRAN, J. The effect of a commercial probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 24, p. 1-12, 2013.

SÝKORA, J.; VALECKOVA, K.; AMLEROVA, J.; SIALA, K.; DEDEK, P.; WATKINS, S.; VARVAROVSKA, J.; STOZICKY, F.; PAZDIORA, P.; SCHWARZ, J. Effects of a Specially Designed Fermented Milk Product Containing Probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the Eradication of *H. pylori* in Children A Prospective Randomized Double-Blind Study. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, n. 8, p.692-698, 2005.

TACO – **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 113 p., 4.ed. revisada e ampliada. Campinas, SP: NEPA – UNICAMP, 2006.

TAN S. Y.; MATTES R. D. Appetitive, dietary and health effects of almonds consumed with meals or as snacks: a randomized, controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 1205–1214, 2013.

TAN, S. Y.; DHILLON, J.; MATTES, R. D. A review of the effects of nuts on appetite, food intake, metabolism, and body weight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, p. 412–422, 2014.

TURSE, A.; BRANDMARTE, G.; ELISEI, W.; PICCHIO, M.; FORTI, G.; PIANESE, G.; RODINO, S.; D'AMICO, T.; SACCA, N.; PORTINCASA, P.; CAPEZUTTO, E.; LATTANZIO, R.; SPADACCINI, A.; FIORELLA, S.; POLIMENI, N.; STOPPINO, V.; STOPPINO, G.; GIORGETTI, G. M.; AIELLO, F.; DANESE, S. Randomised clinical trial: mesalazine and/or probiotics in maintaining remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease – a double-blind, randomised, placebo-controlled study. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 38, p. 741-751, 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE – USDA. Nutrient Data Laboratory. 2016. **Composition of foods: raw, processed, prepared**. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Disponível em <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3641>. Acessado em 21 de setembro de 2017.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4705–4714, 2006.

WELNA, M.; KLIMPEL, M.; ZYRNICKI, W. Investigation of major and trace elements and their distributions between lipid and non-lipid fractions in Brazil nuts by inductively coupled plasma atomic optical spectrometry. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1012-1015, 2008.

WILSON, B. S. S.; BLASCHEK, K.; MEJIA, E. G. de. Allergenic Proteins in Soybean: Processing and Reduction of P34 Allergenicity. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 2, p. 47-58, 2005.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**, v. 23, p. 62-68, 2007.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p.1573-1580, 2009.

ZONA CEREALISTA. Seção Castanha do Pará. Disponível em: <<https://www.zonacerealista.com.br/frutas-oleaginosas/castanhas-do-para.html>>. Acessado em 30 de outubro de 2018.

ZUBAIDAH, E.; NURCHOLIS, M.; WULAN, S. N.; KUSUMA, A. Comparative Study on Synbiotic Effect of Fermented Rice Bran by Probiotic Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus casei* and Newly Isolated *Lactobacillus plantarum* B2 in Wistar Rats. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 170–177, 2012.

CAPÍTULO II

ENSAIOS PRELIMINARES

1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL INICIAL

Para o desenvolvimento da bebida foi proposto um planejamento experimental, a fim de determinar as melhores condições de processo. Foram utilizadas as seguintes variáveis independentes: temperatura de fermentação, tempo de fermentação, concentração de inulina e concentração de pectina cítrica, conforme o Quadro 5.

Quadro 5 – Níveis de temperatura, tempo, inulina e pectina.

Níveis	Variáveis			
	Temperatura	Tempo	Inulina	Pectina
	30, 37 e 42 °C	3, 5 e 7 horas	0, 2,5 e 5 %	0, 0,5 e 1 %

A faixa de concentração de inulina estudada foi fundamentada na quantidade mínima (2,5 g por porção) estabelecida pela ANVISA desse componente para que alimento possa receber alegação funcional mediante sua presença no produto. Foi considerada uma porção de 100 g e a concentração de 5 % foi utilizada como ponto de extrapolação (dobro da quantidade mínima). A concentração de pectina utilizada foi baseada em ensaios laboratoriais que, através do teste de proveta, observou-se uma menor separação de fases mediante a adição de pectina. Em relação ao tempo e temperatura de fermentação, os níveis estudados foram baseados nas informações descritas na literatura científica, que indicam, em sua grande maioria, o tempo mínimo e máximo de 3 horas e 7 horas, respectivamente, e a temperatura mínima e máxima de fermentação de 30 °C e 37 °C, respectivamente, para que seja atingido o valor de pH próximo a 4,5 e contagens satisfatórias para o micro-organismo probiótico (superior a 6,00 log UFC/mL, na elaboração de bebidas fermentadas à base de soja – utilizada como referencial devido a ausência de estudos que utilizaram a castanha-do-Brasil como base (ROSSI et al. 1990; ROSSI et al., 1999; FUCHS et al., 2005).

Desta forma, foi construído um planejamento fatorial incompleto 2^4 com pontos centrais, conforme apresentado no Quadro 6. Os parâmetros de processo foram determinados a partir das melhores respostas de pH e contagem do *Lactobacillus casei* frente às diferentes combinações expressas no planejamento.

Quadro 6 – Planejamento fatorial incompleto 2^4 com pontos centrais.

Corridas	Variáveis			
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Inulina (%)	Pectina (%)
1	30	3	0	0
2	42	3	0	1
3	30	7	0	1
4	42	7	0	0
5	30	3	5	1
6	42	3	5	0
7	30	7	5	0
8	42	7	5	1
9 (C)	37	5	2,5	0,5
10 (C)	37	5	2,5	0,5
11 (C)	37	5	2,5	0,5

A partir do planejamento, foram realizados ensaios, avaliando o decréscimo do pH e a enumeração do *L. casei*, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Decréscimo do pH e enumeração do *L. casei* - Planejamento fatorial.

Corridas	pH	Contagem (log UFC/mL)
1	5,87 ± 0,60	3,80
2	5,90 ± 1,69	3,95
3	5,87 ± 0,03	3,64
4	5,85 ± 1,01	3,58
5	5,85 ± 0,48	3,76
6	5,88 ± 0,56	3,50
7	5,89 ± 0,28	3,44
8	5,91 ± 0,12	3,19
9 (C)	5,67 ± 0,19	4,20
10 (C)	5,63 ± 0,01	4,35
11 (C)	5,60 ± 0,13	4,40

A partir do ensaio, foi possível observar que o tempo de fermentação não foi suficiente para que se fossem obtidos valores de pH e contagens próximos aos esperados. Entretanto, os pontos centrais (9, 10 e 11) apresentaram valores mais destacáveis. Desta forma, assumiu-se as condições de processo desses pontos para a realização de uma cinética de desenvolvimento microbiano, a fim de determinar qual o tempo necessário para que se fosse obtido os valores de pH e contagens adequados.

As Figuras 7 e 8 trazem as curvas de alteração de pH e desenvolvimento do *L. casei* durante 26 horas de fermentação.

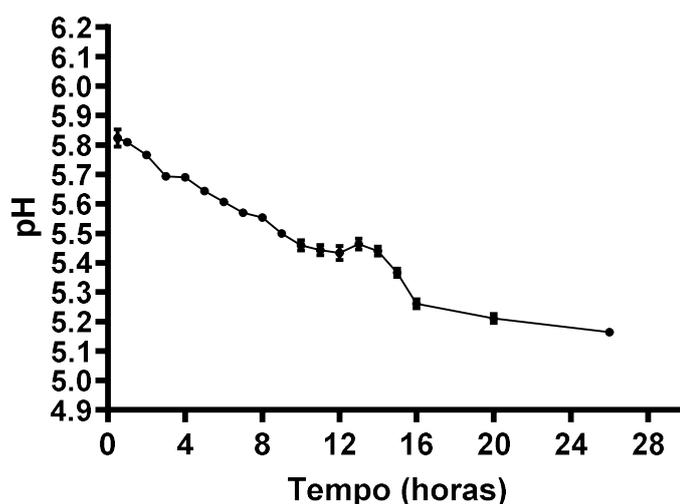


Figura 7 – Curva de alteração de pH durante processo fermentativo.

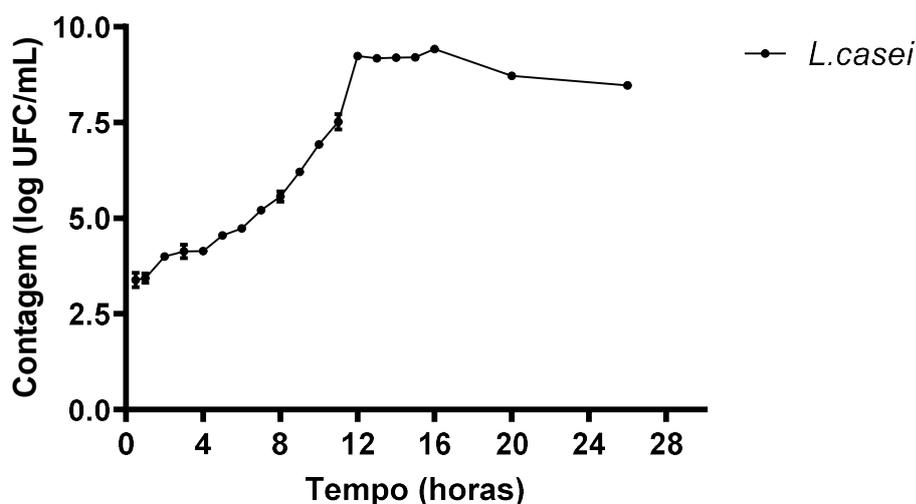


Figura 8 – Curva de desenvolvimento do *L. casei* durante processo fermentativo.

A partir das Figuras 7 e 8, é possível observar que após 12 horas de fermentação a contagem de *Lactobacillus casei* não apresentou diferença significativa. A bebida apresentou capacidade tamponante, uma vez que o pH resistiu a mudanças bruscas.

Desta forma, foram adotadas as seguintes condições de processo: 37 °C, 12 horas de fermentação, 2,5% de inulina e 0,5% de pectina.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FUCHS, R. H. B.; BORSATO D.; BONA, E.; HAULY, M. C. de O. “Iogurte” de Soja Suplementado com Oligofrutose e Inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 175-181, 2005.

ROSSI, E. A.; FARIA, J. B.; BORSATO, D.; BALDOCHI, F. L. Otimização de um sistema para o “iogurte” de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.2, p. 83-92, 1990.

ROSSI, E. A.; VENDRAMININ, R. C.; CARLOS, I. Z.; PEI, Y. C.; VALDEZ, G. F. de. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. **European Food Research and Technology**, v. 209, p. 305-307, 1999.

CAPÍTULO III

DEVELOPMENT OF A NON-DAIRY DRINK WITH SYMBIOTIC POTENTIAL BASED ON BRAZIL NUTS FERMENTED BY *Lactobacillus casei* WITH THE ADDITION OF INULIN

Paulo Cezar da Cunha Júnior^a, Lorena de Sá de Oliveira^b, Lucas de Paiva Gouvêa^b, Mayara Limas Silva^b, Jade Guedes Martins^b, Tayná Gomes Silva^b, Marcela de Alcantara^c, Ivanilda Maria Augusta^b, Sandra Guadalupe Lagunes Gálvez^d, Sandra Regina Gregório^b, Amauri Rosenthal^c, Elisa Helena da Rocha Ferreira^b

^a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rodovia BR 465, km 07, s/n - Zona Rural, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil.

^b Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Rodovia BR 465, km 07, s/n - Zona Rural, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil.

^c Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas, 29501, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^d Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Avenida Abraham Lincoln esquina Rómulo Betancourt, 2748, Santo Domingo, Distrito Nacional, Dominican Republic.

**Manuscrito submetido para publicação na Revista LWT – Food Science and Technology
(Qualis A1 – Ciência de Alimentos)**

ABSTRACT

A non-dairy symbiotic drink was developed using Brazil nuts, pectin, demerara sugar, inulin and *Lactobacillus casei* 01 as probiotic. The contents of moisture, lipids, proteins, carbohydrates, fibers and ashes were analyzed for the Brazil nut extract and for the fermented beverage. The physical and chemical changes after fermentation were evaluated during 28 days of storage under refrigeration and presented variations from 5.56 to 5.16 for pH, 0.12 to 0.19 g/100 mL for acidity in terms of lactic acid and 11.00 to 12.33 °Brix for soluble solids. The viability of the microorganism was also measured during storage, with counts above 8.00 log CFU/mL. The fermented beverage presented microbiological quality, since the development of molds and yeasts, Salmonella spp. and total and thermotolerant coliforms was not observed. Regarding the survival of *Lactobacillus casei* in relation to the conditions of the gastrointestinal tract, the probiotic was shown to be feasible, since counts above 6 log CFU/mL were achieved upon reaching the enteric stage. The acceptability of the beverage was evaluated through the attributes global acceptance, fermented aroma, sweetness, nut flavor and fermented taste, obtaining intermediate scores ranging from 5.41 to 6.02.

Keywords: *Lactobacillus casei*; non-dairy fermented milk; probiotic drink; Brazil nuts.

1. INTRODUCTION

Consumer interests in new healthy eating habits have strongly boosted the functional food market, highlighting the increased intake of products presenting bioactive compounds. These products provide better quality of life and well-being, leading to physical and mental health benefits, in addition to supplying nutritional needs (Arihara, 2014; Kuster-Boluda & Vidal-Capilla, 2017). It is estimated that the functional food market presented a turnover of 300 billion dollars in 2017, with a projected revenue for 2022 of 440 billion dollars (Statista, 2018).

Among the functional foods available worldwide, some contain probiotics and prebiotics, which can be ingested either in isolation or in combination. Probiotics are defined as microorganisms which, when ingested in adequate amounts, can bring benefits to host health (Reid, 2016). For a micro-organism to be classified as probiotic, certain aspects should be taken into account, such as resistance to gastrointestinal tract conditions and the ability to reduce pathogenic microorganism adhesion to the intestinal mucosa (Hill et al., 2014; Kolaček et al., 2017). Prebiotics, in turn, are defined as components selectively metabolized by microorganisms, providing health benefits to the host. Oligosaccharides and inulin are examples of compounds presenting prebiotic claims (Gibson et al., 2017). The combined use of probiotics and prebiotics can be defined as symbiotic, consisting in the mutual exploitation of their benefits (Virk et al., 2013).

Probiotics, for the most part, are used in the composition of dairy products. However, the use of proteins and components of plant origin for food processing is constantly expanding, due to the increase in cases of lactose intolerance, allergy to milk proteins and veganism and strict vegetarianism adhesion (Kandyliis, Pissaridi, Bekatorou, Kanellaki, & Koutinas, 2016). So-called “vegetable milks” have emerged as a market and consumer trend, prompting industries to seek alternatives free of animal components in order to meet the demands of this specific public. These "milks" present remarkable biological quality, due to the presence of fibers, minerals, unsaturated fatty acids, vitamin B and isoflavones (Zhao & Shah, 2014; İçier, Gündüz, Yilmaz, & Memeli, 2015). Some options present visual similarity to cow's milk and are consumed pure or combined with fruits, flavored and as a part of food compositions.

In the scientific sense, the use of diversified raw materials is proposed, such as oilseeds, cereals, grains and tubers. In addition, research that makes use of raw materials native to certain regions are also noteworthy, such as tiger nuts, baru almonds, royal quinoa and hazelnuts (Bianchi, Rossi, Gomes, & Sivieri, 2014; Bernat, Cháfer, Rodríguez-García, Chiralt, & González-Martínez, 2015; Codina-Torrella, Guamis, Ferragut, & Trujillo, 2017; Fioravante, Hiane, & Neto, 2017). The Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) is natural occurring in the Amazon region, sensorially pleasant and with high nutritional and biological quality, consumed mainly dehydrated or in low added value compositions. Thus, this oleaginous appears as an excellent alternative for the development of new products, especially in the development of beverages presenting functional properties (Yang, 2009).

Several authors have carried out trials using probiotics in plant matrices, especially studies applying probiotics strains, using different non-dairy substrates, namely: cashew apple (Kaprasob, Kerdchoechuen, Laohakunjit, Sarkar, & Shetty, 2017), quinoa and soy (Bianchi et al., 2014), fig (Kherzi, Dehghan, Mahmoudi, & Jafarlou, 2016), soybean (Kwon, Lee, Lee, Chang, & Chang, 2000) and barley, finger millet and moth bean (Chavan, Gat, Harmalkar, Waghmare, 2018). The remarkable adaptation of this species in different matrices, the significant diffusion of products containing *Lactobacillus casei* and the numerous benefits reported in the literature, such as: improvement in the treatment of H. pylori eradication in children with gastritis (Sýkora et al., 2005); reduced chances of developing diabetes (Yadav,

Jain, & Sinha, 2007); reduced risks of infectious diseases in stressed individuals (Guillemard, Tanguy, Flavigny, Motte & Schrezenmeir, 2013); improvement in oral and dental health (Sutula, Coulthwaite, Thomas, & Verran, 2013) justify its wide use in the research and development of new products and processes.

Few studies on the use of Brazilian nuts in the elaboration of fermented beverages are available. Thus, the aim of this study was to develop and characterize a Brazil nut beverage fermented by *Lactobacillus casei* and added inulin. The survival rates of the probiotic microorganisms after exposure to *in vitro* gastrointestinal tract conditions and sensory acceptance were also evaluated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials used

Brazil nuts (BN) used to produce the beverage were collected from the Xapuri region, Acre, Brazil. Citrus pectin (Mago, São Paulo, Brazil) used as a thickening and stabilizing agent and demerara sugar (União, São Paulo, Brazil) were obtained from local markets in the municipalities of Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil, respectively. Inulin prebiotic fiber was supplied by Sweetmix®. A lyophilized culture of the microorganism *Lactobacillus casei* (L. casei 01) (Christian Hansen, Valinhos, Brazil) was used as the probiotic.

2.2. Preparation of Brazil nuts and their aqueous extract

Brazil nuts with bark were received, selected and washed, to remove damaged almonds and coarse solids. The nuts were then autoclaved at 121 °C and 1 atm for 30 minutes. After autoclaving, the nuts were immersed in an ice bath and proceeded to the peeling stage, in order to remove the edible portion. The peeled nuts were then washed in running water, sanitized by immersion in a chlorinated solution at 200 ppm for 20 minutes and rinsed under running water. After rinsing, the almonds were frozen (-18 ± 2 °C) in polypropylene bags for later use.

For the preparation of the Brazil nut extracts, the previously sanitized and nuts were ground in water using a high-speed industrial blender LI-1,5-N (Skymesen, Santa Catarina, Brazil) for 10 minutes, at a 1:4 (Brazil nut: mineral water) ratio. The obtained liquid was then filtered to remove not soluble solids.

2.3. Preparation of the symbiotic Brazil nut drink (SBND)

Inulin (2.5% w/v), pectin (0.5% w/v) and demerara sugar (5% w/v) were added to the Brazil nut extract and subjected to pasteurization at 80 ± 1 °C for 20 minutes. After heat treatment, the extracts containing inulin, pectin and demerara sugar were cooled in an ice bath until 37 °C. Subsequently, the freeze-dried probiotic *Lactobacillus casei* (L. casei 01) culture was added to the Brazil nut extract at an initial count of 6.50 logs CFU/g. After addition of the probiotic culture, the Brazil nut extracts were incubated in an unventilated oven at 37 °C, under anaerobic conditions, for 12 hours. After fermentation, the beverage (SBND) was bottled in sterile glass bottles and subjected to maturation for 24 hours under refrigeration at 4 ± 1 °C. After maturation, the beverage remained under refrigeration at 4 °C for further analyses.

2.4. Physico and chemical analyses

2.4.1. Chemical composition

Moisture, lipids, proteins and ashes were determined according to the methodology stipulated by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2004). Total carbohydrates were determined by the phenol-sulfuric method, according to Dubois, Gilles,

Hamilton, Rebers, & Smith (1956). Soluble and insoluble fibers were determined by the gravimetric-enzymatic method, following Buriti, Freitas, Egito, & Santos (2014). The assays were carried out in triplicate for Brazil nut aqueous extract containing inulin, pectin and demerara sugar (BNE) and SBND, in order to verify possible changes after fermentation.

2.4.2. Analysis of physical and chemical quality during 4 weeks of storage

pH was determined using a digital potentiometer (Ohaus Starter 2100, Canada). Acidity (LA) in terms of lactic acid was determined by the titrimetric method using 0.1 N sodium hydroxide solution as titrant and phenolphthalein ethanolic solution as indicator, following the procedure indicated by AOAC (2004). The readings were expressed in g/100 mL. Soluble solid contents (SS) were determined using a manual refractometer (Instrutherm, Brazil), at a scale of 0 to 75% and expressed as °Brix. Instrumental color was determined by reflectance using a Color Quest XE equipment (Hunter Lab, Reston, USA) applying the CIELAB and CIELABh scales, with an aperture of 0.375 mm in diameter and D65/10 illuminant. Samples were placed in a 10 mm quartz cuvette and six replicates were performed for each sample. The analyzed color parameters were: L*, a*, e b*, at where: L* is the measure of luminosity and varies from black (0) to white (100), a* varies from green (-80 to zero) to red (zero to +100) and b* varies from blue (-100 to zero) to yellow (zero to +70). The Chroma (C*) was calculated by Eq. 1 in a polar coordinate system and the hue angle (h°) was determined by Eq. 2. All assays were performed in triplicate.

$$C^*=(a^{*2}+ b^{*2})^{1/2} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$h^\circ=\text{arctang}(b^*/a^*) \quad (\text{Eq. 2})$$

2.5. Microbiological analyses

2.5.1. Microbiological quality analysis during 4 weeks of storage

The microbiological quality of the beverage was evaluated by the enumeration of molds and yeast, *Salmonella* spp., total and thermotolerant coliforms determination, following APHA (2001). For coliforms, counts were expressed as MPN/mL of the beverage. The count for molds and yeasts were expressed as CFU/mL of the beverage. Only the presence or absence of *Salmonella* spp. was determined. The assays were performed in triplicate during beverage storage at 4 ± 1 °C, at 0, 7, 14, 21 and 28 days.

2.5.2. Enumeration of probiotic counts and survival after gastrointestinal resistance *in vitro* during 4 weeks of storage

Lactobacillus casei counts were performed on Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Merck, Darmstadt, Germany), containing a 2% w/v sancomycin sterile solution (0.5 mL of solution in 1000 mL of agar). The microtiter technique was used, where 20 µL aliquots were incubated in plates containing MRS agar, from serial dilutions in sterile peptone (10^{-1} to 10^{-9}). The plates were then incubated at 37 ± 1 °C in an unventilated oven for 72 h under anaerobic conditions. Counts were expressed as log CFU/mL (Colony Forming Units per milliliter of the beverage).

The *in vitro* simulation of gastrointestinal tract conditions was performed by adapting the methodology reported by Favarin, Laureano-Melo, & Luchese (2015). The gastric phase was simulated by exposure to a sterile KCl (1,12 g/L), NaCl (2.00 g/L) and NaH₂PO₄ (0.40 g/L) solution containing mucine III (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (3.50 g/L) and purified pepsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), at 3.50 g/L and 0.26 g/L, respectively. The pH was adjusted to 1.4-1.9 using concentrated HCl. The enteric phase was divided into two stages and simulated by exposure to bile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and pancreatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 10 g/L and 1.95 g/L, respectively. In the first step, the

pH of the bile and pancreatin were set at pH 4.30-5.20 using NaHCO₃. In the second step, the pH was adjusted to 6.5 - 7.5, also using NaHCO₃. All simulations were performed under constant shaking at 50 rpm in a refrigerated NT 715 shaker incubator (Novatecnica, Rio de Janeiro, Brazil) at 37 °C. Aliquots were taken at 0, 30, 60, 120 (gastric phase), 180, 240 (enteric phase - first stage), 300 and 360 minutes (enteric stage - second stage) to assess *Lactobacillus casei* survival against gastrointestinal tract conditions, totaling 6 hours of procedure. *Lactobacillus casei* enumerations were performed in triplicate during beverage storage at 4 ± 1°C at the following times: 0, 7, 14, 21 and 28 days of storage and after *in vitro* simulation of gastrointestinal tract conditions at 0 and 28 days of storage.

2.6. Sensory evaluation

SBND sensorial characteristics were evaluated by adapting the methodologies proposed by Bianchi et al. (2014). An acceptance test was applied, performed by 60 untrained volunteers (29 male = and 31 female, aged between 18 and 60 years). The evaluators were recruited among students and employees of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil). During the session, each participant received 30 mL of the sample, at approximately 4 ± 1°C, in a white plastic cup, coded with random three-digit numbers. A structured hedonic nine-point scale, numbered 1 to 9, was used, presenting the following sequence: 9 - I liked it very much; 8 - I liked it a lot; 7 - I liked it regularly; 6 - I liked it slightly; 5 - neither liked nor disliked; 4 - slightly disagree; 3 - I disliked it regularly; 2 - I was displeased; 1 - I was very displeased. The test was applied in order to determine acceptance against the following attributes: Global acceptance; Fermented aroma; Sweetness; Brazil nut flavor; Fermentation flavor.

The research project was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), under registration number CAAE - 93560518.6.0000.5285.

2.7. Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) test was applied to compare the effects of the different treatments, and the Tukey test was used to determine difference between treatments, both at a confidence interval of 5% (p-value). Statistical analyses were performed using the STATISTICA 7.0 software (StatiSoft, Inc., Tulsa, Okla., USA) and Graphpad Prism software (version 6, Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA). All tests were carried out in triplicate and the results presented as means ± standard deviation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Physico and chemical analyses

3.1.1. Chemical composition

The lipid, protein, carbohydrate, ash and fiber contents for BNE and SBND were determined on a wet basis (Table 7). The chemical compositions of BNE and SBND were expressed as g / 100 g of the drink.

Table 7 – Chemical composition of aqueous extract of Brazil nuts added with inulin, pectin and demerara sugar (BNE) e symbiotic Brazil nuts drink (SBND).

	Moisture*	Lipid*	Protein*	Total carbohydrate*	Fiber*	Ash *
BNE¹	73.06 ^a ± 0.06	11.76 ^a ± 2.71	3.31 ^a ± 0,55	8.63 ^a ± 0.94	3.11 ^a ± 1.26	0.13 ^a ± 0.02
SBND²	81.35 ^b ± 0.02	11.75 ^a ± 0,07	3.01 ^a ± 0.70	1.39 ^b ± 0.15	2.42 ^b ± 0.10	0.08 ^b ± 0.03

* Contents em g/100 g of drink. ^{a-b} Different letters in the same column mean significant difference (p -value <0.05). ¹ Aqueous extract of Brazil nuts added with inulin, pectin and demerara sugar. ² Symbiotic Brazil nuts drink.

A significant change (p -value > 0.05) in centesimal composition was observed after fermentation regarding fiber, ash, total carbohydrates and moisture content. Fiber decay occurred due to its use by *Lactobacillus* during the fermentation process. In general, fibers are degraded and converted into nutrients that favor lactic acid bacteria development. Similar to fibers, total carbohydrates also suffered a drop in concentration. Carbohydrates were enzymatically hydrolyzed, resulting in the release of less complex sugars, easily used by *Lactobacillus casei* as an energy source during its multiplication and development (Kapasob et al., 2017). Regarding mineral content, a 38.5% decrease was observed after fermentation. Even at reduced concentrations, minerals are of extreme importance for microorganism multiplication in general, since they are associated to several enzymatic reactions, therefore justifying their consumption in such a noteworthy manner (Walker, 2004).

3.1.2. Physical and chemical quality analyses during 4 weeks of storage

pH changes were assessed in the SBND after 12 hours of fermentation (0 days) and at the other storage times (7, 14, 21 and 28 days), presenting the following values: 5.56, 5.52, 5.28, 5.27 and 5.16, respectively (Table 8).

Table 8 – Values of pH, soluble solids (SS) and acidity in lactic acid (LA) of symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.

Days of storage*	pH	SS (°Brix)	LA (g/100 mL)
0 days	5.56 ^a ± 0.04	11.00 ^a ± 0.00	0.12 ^a ± 0.01
7 days	5.52 ^a ± 0.01	11.00 ^a ± 0.00	0.12 ^a ± 0.01
14 days	5.28 ^b ± 0.02	12.17 ^b ± 0.29	0.14 ^{ab} ± 0.01
21 days	5.27 ^b ± 0.04	12.50 ^b ± 0.00	0.17 ^{bc} ± 0.01
28 days	5.16 ^c ± 0,01	12.33 ^b ± 0.58	0,19 ^c ± 0.01

* Storage under refrigeration (4 ± 1 °C). ^{a-c} Different letters in the same column mean significant difference (p -value <0.05).

Significant differences (p -value > 0.05) between 7 and 14 days and between 21 and 28 days of storage were noted. In addition, decreasing pH values during the 28 days of analysis were also observed (Fig. 9).

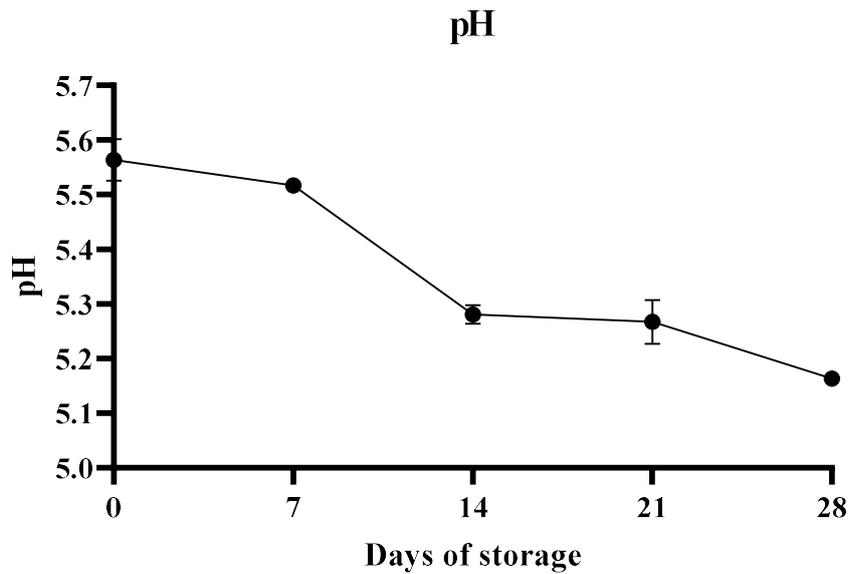


Figure 9 – Changes in pH during during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (0 – 28 days).

SBND acidity was also determined at 0, 7, 14, 21 and 28 days of storage and expressed in relation to lactic acid concentrations determined as: 0.12, 0.12, 0.14, 0.17 and 0.19 in g/100 mL (Table 8).

A slight increase in lactic acid content was observed, significantly higher ($p\text{-value} > 0.05$) from the 14th day of storage (Fig. 10). Acidity and pH differences occurred due to the nutritional profile of the raw material used herein, as well as other SBND components.

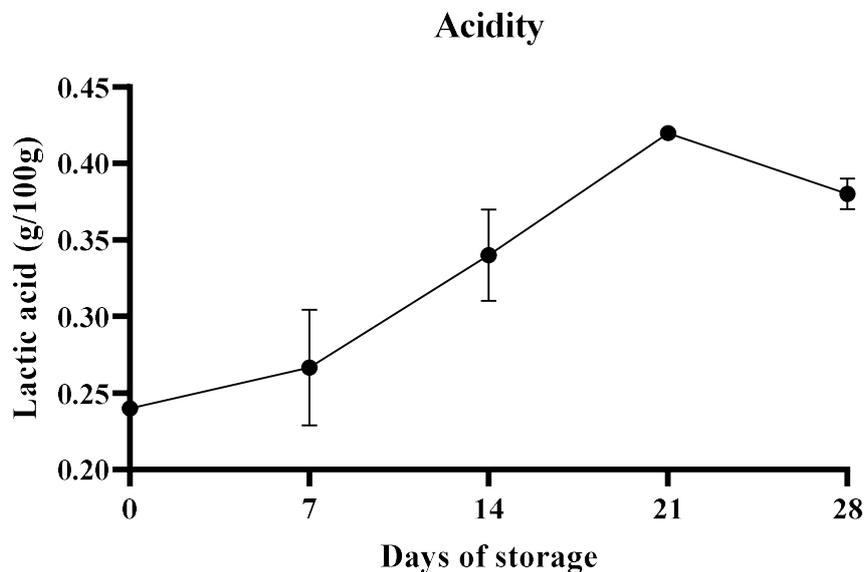


Figure 10 – Changes in acidity during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (0 – 28 days) in terms of lactic acid.

The Brazil nut is a recognized source of protein, providing satisfactory nitrogen content for lactic acid synthesis. The decrease in pH observed herein is justified by *Lactobacillus casei* metabolism, which makes use of the fermentable sugars present in SBND resulted from sucrose hydrolysis during fermentation. The low activity of this microorganism results in the release of

organic acids, leading to pH changes even at storage (refrigerator) temperature (Kwon et al., 2000; Sharma, Trivedi, & Gat, 2017; Chavan et al., 2018).

The increase of soluble solids contents, expressed as °Brix, were also observed during storage, with significant differences (p -value > 0.05) noted only between 7 and 14 days of storage (Fig. 11 and Table 8).

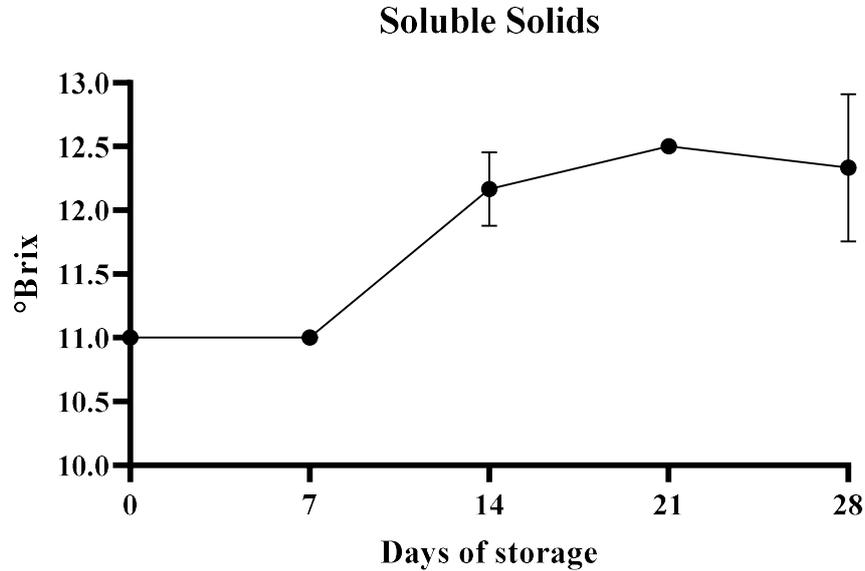


Figure 11 – Changes in soluble solids during during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (0 – 28 days).

Concerning instrumental color, significant changes (p -value > 0.05) were observed for all analyzed parameters (L^* , a^* , b^* and, consequently, C^*). The increases noted for b^* between 21 and 28 days are noteworthy, indicating that the beverage became more yellow during storage (Table 9).

Table 9 – Colour parameters of symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.

	Days of storage*				
	0 days	7 days	14 days	21 days	28 days
L^*	74.40 ^a ± 0.94	74.79 ^a ± 0.52	74.64 ^a ± 0.14	77.29 ^b ± 1.10	85.23 ^b ± 0.92
a^*	0.03 ^a ± 0.07	-0.36 ^b ± 0.09	-0.30 ^b ± 0.05	-0.38 ^b ± 0.03	-0.11 ^a ± 0.37
b^*	5.07 ^a ± 0.19	4.63 ^{ab} ± 0.10	4.19 ^b ± 0.01	4.14 ^b ± 0.08	7.44 ^c ± 0.86
C^*	5.07 ^a ± 0.19	4.35 ^b ± 0.16	4.20 ^b ± 0.01	4.16 ^b ± 0.08	7.45 ^c ± 0.86
h°	89.71 ^a ± 0.82	94.64 ^b ± 1.04	94.12 ^b ± 0.69	95.21 ^b ± 0.30	88.85 ^a ± 2.82

* Storage under refrigeration ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). ^{a-c} Different letters on the same line mean significant difference (p -value < 0.05).

Increasing yellow intensity color may be caused by oxidative and non-oxidative reactions involving lipids and polyphenols, generating colored condensation compounds. In addition, the formation of color products by the Maillard reaction or by the generation of

melanoidines is also possible, albeit more discreetly (Tajchakavit, Boye, Bélanger, & Couture, 2001).

3.2. Microbiological analysis

3.2.1. Analysis of microbiological quality during 4 weeks of storage

During the 28 days of beverage storage, the growth of characteristic mold and yeast colonies in potato dextrose agar was not observed. *Salmonella* spp. were not detected. Either the enumeration of total and thermotolerant coliforms indicated satisfactory levels throughout the storage period. The results are displayed in Table 10. The combination of the conservation processes (pasteurization, fermentation and storage under refrigeration) was satisfactory for microbiological quality product maintenance.

Table 10 – Microbiological quality and enumeration of probiotic count in symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.

	Days of storage*				
	0 days	7 days	14 days	21 days	28 days
Molds and yeasts (CFU/mL)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> spp.	Absence in 25 mL				
Total coliforms (MPN/mL)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Thermotolerant coliforms (MPN/mL)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
<i>Lactobacillus casei</i> (log CFU/mL)	9.46 ^a ± 0.16	8.88 ^b ± 0.15	8.87 ^b ± 0.01	8.59 ^c ± 0.14	8.58 ^c ± 0.09

* Storage under refrigeration (4 ± 1 °C). ^{a-c} Different letters on the same line mean significant difference (*p-value* <0.05).

3.2.2. Enumeration of probiotic count and survival after gastrointestinal resistance during 4 weeks of storage

The initial count of the lyophilized culture used to ferment the BNE was of 6.50 logs CFU/mL. *Lactobacillus casei* presented counts ranging from 9.48 to 8.59 log CFU/mL, with a 0.89 log cycle reduction between 0 and 28 days of storage. Although the number of viable cells decreased during storage, the count was higher than 8.00 log CFU/mL, which is considered satisfactory for products fermented by probiotic microorganisms (Fig. 12 and Table 10).

Viability of *Lactobacillus casei*

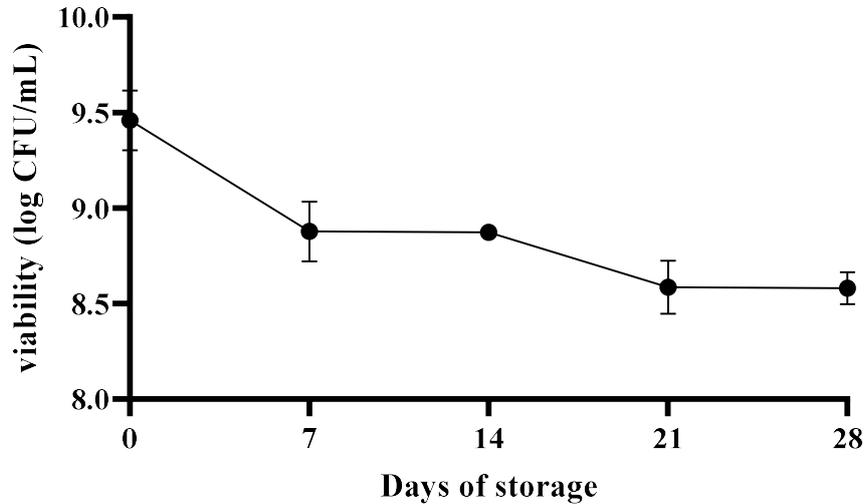


Figure 12 – Evaluation of viability of *Lactobacillus casei* during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage (4 weeks).

The viability of *Lactobacillus casei* was assessed after exposure to gastrointestinal tract conditions for up to 360 minutes at 0 and 28 days of storage. At 0 days of storage, *Lactobacillus casei* presented higher resistance to the established experimental conditions concerning the gastric phase (0, 30, 60 and 120 minutes of exposure), where only a 0.24 log cycle reduction was observed. However, during the two stages of the enteric phase (180, 240, 300 and 360 minutes), an expressive decrease in the viability of this microorganism was noted, with a 5.20 log cycle reduction compared to the initial count. The assessment carried out at 28 days of storage presented a different profile, where a 1.7 log cycle reduction was observed in the first 30 minutes of the gastric phase, ending this phase at a 2.54 log cycle variation. However, *Lactobacillus casei* behavior in the enteric phase presented a lesser reduction when compared to the counts of this phase at 0 days of storage, of 4.37 log cycle in relation to the initial number of viable colonies (Figure 13 and Table 11).

Table 11 – Survival of *Lactobacillus casei* after gastrointestinal resistance *in vitro* in symbiotic Brazil nuts drink (SBND) during 4 weeks of storage.

Days of storage*	Exposure time**							
	0 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes	240 minutes	300 minutes	360 minutes
0 days	9.24 ^{Aa} ±	9.18 ^{Aa} ±	9.18 ^{Aa} ±	9.00 ^{Ab} ±	6.27 ^{Ac} ±	6.23 ^{Ac} ±	6.18 ^{Ac} ±	4.02 ^{Ad} ±
(log CFU/mL)	0.11	0.06	0.80	0.14	0.15	0.10	0.05	0.12
28 days	8.58 ^{Ba} ±	6.89 ^{Bb} ±	6.57 ^{Bc} ±	6.04 ^{Bd} ±	6.02 ^{Bd} ±	5.03 ^{Bc} ±	4.56 ^{Bf} ±	4.20 ^{Bg} ±
(log CFU/mL)	0.09	0.02	0.03	0.03	0.02	0.06	0.03	0.14

* Storage under refrigeration ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). ** Exposure time of the microorganism to the gastric (0, 30, 60 and 120 minutes) and enteric (180, 240, 300 and 360 minutes) phases. ^{a-g} Different letters on the same line mean significant difference ($p\text{-value} < 0.05$). ^{A-B} Different letters in the same column mean significant difference ($p\text{-value} < 0.05$).

Survival of *Lactobacillus casei*

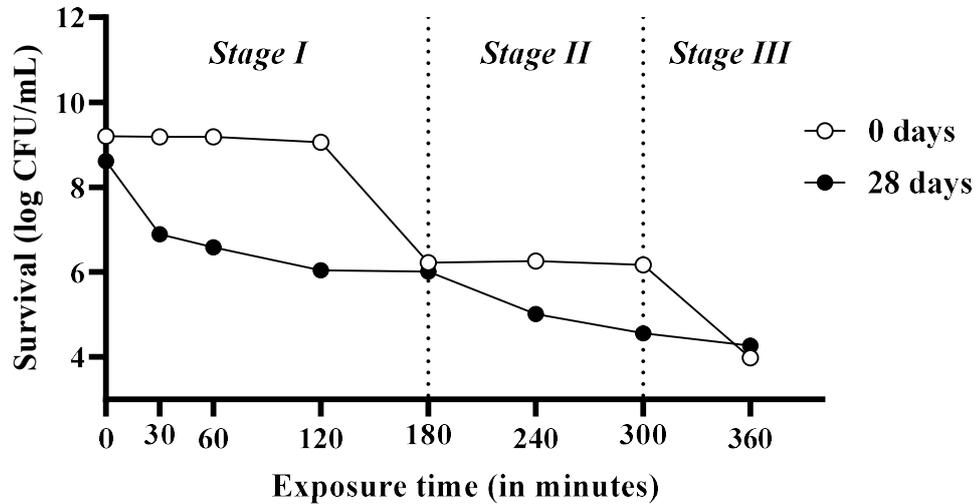


Figure 13 – Survival of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions *in vitro* for up to 360 minutes during 4 weeks of storage (0 days – open circles and 28 days – solid circles).

Even with counts above 8.00 log CFU/mL during the 28 days of beverage storage, a drastic reduction in the number of viable cells was observed when exposed to gastrointestinal tract conditions. Thus, the components present in the applied matrix did not exert a protective effect on *Lactobacillus casei*. It is also noteworthy that the beverage contains inulin, a polysaccharide with a recognized protective effect, which was still not able to exert a beneficial effect on microorganism maintenance during its *in vitro* exposure to the gastric and enteric phases. However, SBND may be considered a functional product, as the therapeutic effects of a microorganism described as a probiotic are only guaranteed when it reaches the intestine with a minimum count of 6 log CFU, which was observed herein (Casarotti, Carneiro, & Penna, 2014; Espitia, Batista, Azeredo, & Otoni, 2016).

3.3. Sensory evaluation

The sensorial evaluation was carried out to verify consumer beverage acceptance. Table 12 and Fig. 14 presents the overall acceptance, fermented aroma, sweetness, nut flavor and fermented flavor scores for the SBND.

Table 12 – Sensory scores of symbiotic Brazil nuts drink (SBND).

	Attributes				
	Global acceptance	Fermented aroma	Sweetness	Brazil nuts flavor	Fermented flavor
Scores	5.49 ± 2.39	5.80 ± 2.28	5.63 ± 2.39	6.02 ± 2.32	5.41 ± 2.37

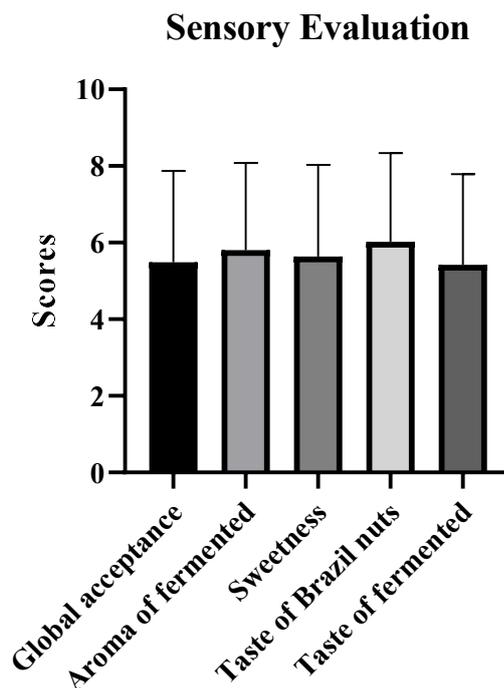


Figure 14 – Sensory acceptance of symbiotic Brazil nuts drink.

The values range from "neither liked nor disliked" to "liked slightly" based on the applied hedonic scale. The attributes presenting lower overall scores were acceptance and fermented flavor. Middle-ranged scores probably occurred because the developed drink presents singular characteristics, far from the sensory memory of the participants. The overall SBND acceptance was average. These results corroborate with the study carried out by Cruz et al. (2010), who emphasize that the sensorial characteristics of a product, especially flavor and aroma, can be negatively affected by components produced by probiotic microorganism metabolism during the fermentation process. However, the application of masking techniques, such as flavoring using fruits, chocolate, vanilla and others, can have a positive effect on the hedonic quality of the product, leading to items presenting therapeutic effects that also meet consumer desires (Kherzi et al., 2016).

4. CONCLUSION

Although dairy bases are the most used matrices for the development of products containing *Lactobacillus casei*, this study evidenced the potential of plant based substrates, especially Brazil nuts, for the elaboration of fermented beverages, free of animal origin components. The fermented beverage was stable, with a 28 day shelf life, when kept under refrigeration, revealing that the combination of different conservation processes was sufficient to guarantee the microbiological stability of the product, without the use of chemical preservatives. Even though changes in physical and chemical characteristics occurred after fermentation and during storage, the fermented product has remarkable levels of lipids, proteins and fibers. It should be noted that the raw material used has high nutritional quality, being a source of biologically active constituents. SBND presented an intermediate sensory evaluation, being necessary the use of artifices that are able to minimize the perception of the products generated during the fermentation process. Obtaining plant products for therapeutic purposes becomes an important tool for enriching the diet of vegetarians, vegans, lactose intolerant and allergic to milk proteins, as it becomes increasingly feasible to offer foods containing probiotics in their composition and that do not violate the premises of food and / or ideological restrictions.

REFERENCES

- AOAC. (2005). Official methods of analysis of the AOAC International (18th ed., rev. 2010). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- APHA. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. (4th ed.) Washington, DC, USA: APHA International.
- ARIHARA, K. (2014). Functional Foods. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 2, 32-36.
- Bernat, N., Cháfer, M., Rodríguez-García, J., Chiralt, A., & González-Martínez, C. Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. (2015). *LWT - Food Science and Technology*, 64, 488-496.
- Bianchi, F., Rossi, E. A., Gomes, R. G., & Sivieri, K. (2014). Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and soy. *Food Science and Technology International*, 21, 403–415.
- Buriti, F. C. A., Freitas, S. C., Egito, A. S., & Santos, K. M. O. dos. (2014). Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 196-203.
- Casarotti, S. N., Carneiro, B. M., & Penna, A. L. B. (2014). Evaluation of the effect of supplementing fermented milk with quinoa flour on probiotic activity. *Journal of Dairy Science*, 97, 6027–6035.
- Chavan, M., Gat, Y., Harmalkar, M., & Waghmare, R. (2018). Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. *LWT*, 91, 339–344.
- Codina-Torrella, I., Guamis, B., Ferragut, V., & Trujillo, A. J. (2017) Potential application of ultra-high pressure homogenization in the physico-chemical stabilization of tiger nuts' milk beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 40, 42-51.
- Cruz, A. G., Cadena, R. S., Walter, E. H. M., Mortazavian, A. M., Granato, D., Faria, J. A. F., & Bolini, H. M. A. (2010). Sensory Analysis: Relevance for Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Product Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 358–373.
- Delgado, S., Guadamuro, L., Flórez, A. B., Vázquez, L., & Mayo, B. (2018). Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high β -glucosidase activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, xxx, xxx–xxx.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C., & Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, 90, 42–52.
- Favarin, L., Laureano-Melo, R., & Luchese, R. H. (2015). Survival of free and microencapsulated *Bifidobacterium*: effect of honey addition. *Journal of Microencapsulation*, 32, 329-335.

- Fioravante, M. B., Hiane, P. A., & Neto, J. A. B. (2017) Elaboration, sensorial acceptance and characterization of fermented flavored drink based on water-soluble extract of baru almond. *Ciência Rural*, 47, p. 1-6.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews – Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491-502.
- Guillemard, E., Tanguy, J., Flavigny, A., Motte, S., & Schrezenmeir, J. (2013). Effects of Consumption of a Fermented Dairy Product Containing the Probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 on Common Respiratory and Gastrointestinal Infections in Shift Workers in a Randomized Controlled Trial. *Journal of American College of Nutrition*, 29, 455-468.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews – Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506-514.
- Içier, F., Gündüz, G. T., Yilmaz, B., & Memeli, Z. Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. (2015). *LWT - Food Science and Technology*, 63, 57-64.
- Kandyli, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58-63.
- Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D., & Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 59, 141–149.
- Kherzi, S., Dehghan, P., Mahmoudi, R., & Jafarlou, M. (2016). Fig Juice Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Nutraceutical Product. *Pharmaceutical Sciences*, 22, 260-266.
- Kolaček, S., Hojsak, I., Canani, R. B., Guarino, A., Indrio, F., Orel, R., Pot, B., Shamir, R., Szajewska, H., Vandenplas, Y., Van Goudoever, J., & Weizman, Z. (2017). Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 65, 117–124.
- Küster-Boluda, I., & Vidal-Capilla, I. (2017). Consumer attitudes in the election of functional foods. *Spanish Journal of Marketing – ESIC*, 21, 65-79.
- Kwon, S., Lee, P. C., Lee, E. G., Chang, Y. K., & Chang, N. (2000). Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 209–215
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30, 17-25.
- Sharma, P., Trivedi, N., & Gat, Y. (2017). Development of functional fermented whey-oat based product using probiotic bacteria. *3 Biotech*, 7, 272.
- Statista. (2018) Functional foods market in the U.S. – Statista dossier on the functional foods market in the U.S. New York, USA: Statista Inc.

- Sutula, J., Coulthwaite, L. A., Thomas, L. V., & Verran, J. (2013). The effect of a commercial probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 24, 1-12.
- Sýkora, J., Valeckova, K., Amlerova, J., Siala, K., Dedek, P., Watkins, S., Varvarovska, J., Stozicky, F., Pazdiora, P., & Schwarz, J. (2005). Effects of a Specially Designed Fermented Milk Product Containing Probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the Eradication of *H. pylori* in Children A Prospective Randomized Double-Blind Study. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 39, 692-698.
- Tajchakavit, S., Boye, J., Bélanger, D., & Couture, R. (2001). Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. *Food Research International*, 34, 431-440.
- Virk, A, Mandrekar, J., Berbari, E. F., Boyce, T. G., Fischer, P. R., Kasten, M. J., Orenstein, R., Rosenblatt, J. E., Sampathkumar, P., Sia, I., Springer, D., & Witzig, T. E. (2013). A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Trial of an Oral Synbiotic (AKSB) for Prevention of Travelers' Diarrhea. *Journal of Travel Medicine*, 20, 88-94.
- Walker, G. M. (2004). Metals in Yeast Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology*, 197-229.
- Yadav, H., Jain, S., & Sinha, P. R. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 23, 62-68.
- Yang, J. (2009) Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1573-1580.
- Zhao, D., & Shah, N. P. Antiradical and tea polyphenol-stabilizing ability of functional fermented soymilk-tea beverage. (2014). *Food Chemistry*, 158, 262-269.

CONCLUSÃO GERAL

Tendo em vista a qualidade nutricional da castanha-do-Brasil e a sua importância socioeconômica para o país, especialmente para a região Norte, é fundamental que hajam estudos que viabilizem, tecnologicamente, sua utilização em novos produtos, agregando maior valor comercial. Somado a isso, o crescimento da produção, consumo e desenvolvimento de alimentos funcionais traz uma enorme possibilidade de inserção desses produtos, principalmente focando atender grupos específicos, como aqueles com alguma restrição alimentar ou que optam por uma alimentação diferenciada. O estado da arte deste trabalho foi o desenvolvimento de um produto diferenciado “*dairy free*”, à base de extrato de castanha-do-Brasil fermentado com *Lactobacillus casei* e adicionado de inulina.

A bebida simbiótica não-láctea foi desenvolvida utilizando castanha-do-Brasil, pectina, açúcar demerara, inulina e *Lactobacillus casei* (L. casei 01 – Crithian Hansen®) como probiótico. As alterações físicas e químicas após a fermentação foram avaliadas ao decorrer de 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C) e apresentaram variações de 5,56 a 5,16 para pH, 0,12 a 0,19 g/100 mL para acidez em termos de ácido láctico e 11,00 a 12,33 °Brix para sólidos solúveis. Os teores de umidade, lipídios, proteínas, carboidratos, fibras e cinzas foram analisados para o extrato aquoso de castanha e para a bebida fermentada. Também foram observadas alterações significativas na composição centesimal do extrato aquoso de castanha após a fermentação no que se refere aos teores de umidade, carboidratos e fibras. Ainda assim, a bebida fermentada obtida apresentou conteúdos satisfatórios de lipídios, proteínas e fibras. A viabilidade do micro-organismo também foi mensurada, apresentando contagens superiores a 8,00 log UFC/mL. A bebida fermentada apresentou qualidade microbiológica, uma vez que não foi observado o desenvolvimento de bolores e leveduras, *Salmonella* spp., coliformes totais e termotolerantes. Quanto a sobrevivência do *Lactobacillus casei* frente às condições do trato gastrointestinal *in vitro*, o probiótico se mostrou viável, uma vez que foram observadas contagens superiores a 6,00 log UFC/mL ao atingir a fase entérica. A aceitabilidade da bebida foi avaliada por meio dos atributos aceitação global, aroma de fermentado, doçura, sabor de castanha e sabor de fermentado, tendo obtido escores intermediários, com variação entre 5,41 a 6,02.

Desta forma, a bebida à base de castanha-do-Brasil fermentada com potencial funcional é perfeitamente viável do ponto de vista tecnológico, apresentando estabilidade microbiológica durante sua vida útil e composição nutricional diferenciada. Sugerindo-se, todavia, novos estudos com a adição de frutas e outros sabores à bebida, a fim de aumentar a sua aceitabilidade entre os grupos com alguma restrição alimentar e/ou ideológicos, bem como entre consumidores sem restringimento.