



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Centro de Ciências Agrárias
Depto. De Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

BRUNA CASTRO ALVES PLANK

FERMENTAÇÃO DE LEITE POR *LACTOBACILLUS CASEI* E
LACTOBACILLUS PLANTARUM CONTENDO YACON:
PROPRIEDADES BENÉFICAS A SAÚDE

Londrina

2021

BRUNA CASTRO ALVES PLANK

FERMENTAÇÃO DE LEITE POR *LACTOBACILLUS CASEI* E
LACTOBACILLUS PLANTARUM CONTENDO YACON:
PROPRIEDADES BENÉFICAS A SAÚDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientadora: Thaís de Souza Rocha

Coorientadora: Karla Bigetti Guergoletto

Londrina

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P712f Plank, Bruna Castro Alves.
FERMENTAÇÃO DE LEITE POR LACTOBACILLUS CASEI E LACTOBACILLUS PLANTARUM CONTENDO YACON: PROPRIEDADES BENÉFICAS A SAÚDE / Bruna Castro Alves Plank. - Londrina, 2021.
68 f. : il.

Orientador: Thaís de Souza Rocha.
Coorientador: Karla Bigetti Guergoletto.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Smallanthus sonchifolius - Tese. 2. Prebióticos - Tese. 3. Leite fermentado - Tese. 4. Atividade antioxidante - Tese. I. Rocha, Thaís de Souza. II. Guergoletto, Karla Bigetti. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

BRUNA CASTRO ALVES PLANK

FERMENTAÇÃO PROBIÓTICA DO LEITE CONTENDO YACON: PROPRIEDADES BENÉFICAS A SAÚDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Adriana Aparecida Bosso Tomal
Universidade do Estado de Minas Gerais - UEMG

Londrina, 27 de agosto de 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio e compreensão.

A professora Thais e a professora Karla, pela orientação, disposição, incentivo e paciência.

A Mayra e a Stael, por serem as melhores estagiárias que já existiram.

Aos colegas que me acompanharam e auxiliaram nesse período, Rodolfo, Thais, Lívia, Samuel, Tatiele, Thainá, Débora, Monike, Viviane, Luma e Natalia.

À Universidade Estadual de Londrina, pela infraestrutura e oportunidade de aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento deste estudo.

Aos docentes e técnicos do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por sempre estarem a disposição e tornarem este trabalho possível.

A todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho, minha eterna gratidão.

PLANK, Bruna C. A. Fermentação probiótica do leite contendo yacon: propriedades benéficas a saúde. 2021. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Para agir beneficemente no organismo, os microrganismos probióticos precisam chegar ao intestino em quantidades adequadas para a colonização. A raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma fonte de frutooligossacarídeos (FOS), grupo de prebióticos que são fermentados por parte seletiva da microflora intestinal e auxiliam os probióticos a exercer seus efeitos no trato gastrointestinal. Este trabalho teve como objetivo avaliar a fermentação do leite por *Lactobacillus casei* (LC-01) e *Lactobacillus plantarum* (BG-112), com diferentes concentrações de farinha da raiz de yacon (0, 3, 6, e 9%), quanto à sobrevivência bacteriana após a simulação da digestão pelo trato gastrointestinal e quanto à atividade antioxidante antes e após a digestão. Curvas de fermentação por 24 h foram analisadas para determinar o tempo ideal de fermentação da bebida. O armazenamento refrigerado foi avaliado retirando amostras nos dias 1, 14 e 28 para realização de análises de viabilidade celular e atividade antioxidante pelos métodos de FRAP e ABTS, antes e após a simulação gástrica. O teor de proteínas solúveis e o perfil de massa molecular foram determinados pelos métodos de Bradford e eletroforese (SDS-PAGE), respectivamente, para avaliar a proteólise antes e após a simulação de digestão das bebidas. As cepas de *L. casei* e *L. plantarum* usadas nesse trabalho foram capazes de utilizar a farinha de yacon como fonte de energia. A presença do yacon aumentou significativamente a sobrevivência bacteriana durante o armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal. As bebidas fermentadas na presença do yacon apresentaram maior capacidade de reduzir íons ferro (FRAP), provavelmente devido a composição do yacon e a maior proliferação de microrganismos observada nestas bebidas. A capacidade de capturar radicais livres determinada pelo método de ABTS aumentou aproximadamente cinco vezes após a digestão, para todas as bebidas, independente da presença de yacon. Durante a digestão também houve intensa hidrólise das proteínas do leite presentes na bebida, a geração de peptídeos bioativos com atividade antioxidante a partir desta proteólise pode explicar o aumento da atividade antioxidante observada pelo método de ABTS após a digestão e como os peptídeos são gerados a partir das proteínas presentes no leite, isso explica por que o yacon não influenciou a atividade

antioxidante após a digestão. Os resultados deste trabalho demonstraram que a fermentação do leite por *L. casei* e *L. plantarum* na presença de yacon aumenta as chances dessas bactérias atingirem o cólon em quantidades adequadas para a colonização e que após a digestão são liberados compostos com atividade antioxidante no trato gastrointestinal do consumidor, que poderão auxiliar no combate ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Smallanthus sonchifolius*, prebióticos, leite fermentado, atividade antioxidante.

PLANK, Bruna C. A. Probiotic fermentation of milk containing yacon: beneficial health properties. 2021. 67p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Londrina State University, Londrina, 2021.

ABSTRACT

To promote health benefits in the human body, probiotic microorganisms must reach the colon in adequate amounts. Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) are a source of fructooligosaccharides (FOS), a group of prebiotics that are selectively fermented by intestinal microorganisms and help probiotics exert their effects in the gastrointestinal tract. This work aimed to evaluate milk fermentation by *Lactobacillus casei* (LC-01) and *Lactobacillus plantarum* (BG-112), with different concentrations of yacon root flour (0, 3, 6, e 9%), on bacterial survival after simulated digestion by the gastrointestinal tract and antioxidant activity before and after digestion. 24 h fermentation curves were analyzed to determine the best time for fermentation of the beverage. On the days 1, 14 and 28 of cold storage, samples were collected and assays were performed on cell viability and antioxidant activity by the FRAP and ABTS methods, before and after *in vitro* digestion. Soluble protein content and molecular mass profile were evaluated by Bradford and electrophoresis (SDS-PAGE) assays, respectively, to evaluate proteolysis before and after the simulated digestion of the beverages. The strains of *L. casei* and *L. plantarum* used in this work were able to utilize yacon flour as an energy source. The yacon content significantly increased bacterial survival during storage and *in vitro* digestion. Beverages fermented in the presence of yacon presented superior capacity to reduce iron ions (FRAP) possibly due to yacon's composition and to the greater proliferation of microorganisms in these beverages. The ability to scavenge free radicals determined with the ABTS method increased approximately five times after digestion, for all beverages, regardless of the presence of yacon. After digestion an intense hydrolysis of milk proteins was observed. The generation of bioactive peptides with antioxidant activity induced by proteolysis may explain the increase in antioxidant activity observed by the ABTS method after digestion and as the peptides are generated from milk proteins, this explains why yacon did not influence the antioxidant activity after digestion. The results of this work demonstrate that fermentation by *L. casei* and *L. plantarum*, in the presence of yacon, increases the chances of these bacteria reach the colon in adequate amounts for colonization and that after digestion, compounds with antioxidant

activity might be released in the gastrointestinal tract of the consumer, which may help to prevent oxidative stress.

Keywords: *Smallanthus sonchifolius*, prebiotics, fermented milk, antioxidant activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Raiz de yacon	16
Figura 2	Frutooligossacarídeos presentes na raiz de yacon	17
Figura 3	Curvas de crescimento e pH de <i>L. casei</i> e <i>L. plantarum</i> em leite com adição de 0%, 3%, 6% e 9% de farinha de yacon por 24 horas de fermentação.	40
Figura 4	Fotos das bebidas de leite fermentados por <i>L. casei</i> e <i>L. plantarum</i> e da farinha de yacon*	44
Figura 5	Contagem de células viáveis e pH no armazenamento refrigerado por 28 dias das bebidas de leite fermentado com diferentes concentrações de yacon	46
Figura 6	Contagem de células viáveis de <i>L. casei</i> e <i>L. plantarum</i> nas bebidas durante a simulação do trato gastrointestinal	48
Figura 7	Determinação da capacidade de sequestro do radical ABTS pelas bebidas fermentadas por <i>L. casei</i> e por <i>L. plantarum</i> antes e após a simulação do trato gastrointestinal.	53
Figura 8	Determinação da capacidade de redução do íon ferro pelas bebidas fermentadas por <i>L. casei</i> e por <i>L. plantarum</i> antes e após a simulação do trato gastrointestinal.	56
Figura 9	Determinação das proteínas solúveis presentes nas bebidas de leite fermentadas por <i>L. casei</i> e <i>L. plantarum</i> , antes e após a simulação da digestão.	58
Figura 10	Perfil eletroforético SDS-PAGE das proteínas presentes nas bebidas fermentadas por <i>L. plantarum</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição média do yacon (g/ 100g)	18
Tabela 2	Formulações das bebidas fermentadas adicionadas de farinha de yacon e microrganismos	29
Tabela 3	Composição centesimal da farinha de yacon calculada em base seca.	35
Tabela 4	Crescimento de <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>L. reuteri</i> em caldo MRS com diferentes fontes de carbono e <i>E. coli</i> em ágar TSA com e sem yacon. Resultados expresso em log de UFC/mL.	36
Tabela 5	Composição centesimal das formulações de leite fermentado por <i>L. plantarum</i> contendo diferentes concentrações de farinha de yacon	42
Tabela 6	Cor instrumental da farinha de yacon e das formulações de leite fermentado por <i>L. casei</i> e <i>L. plantarum</i> contendo diferentes concentrações de farinha de yacon	43
Tabela 7	Porcentagem de sobrevivência do <i>L. casei</i> e do <i>L. plantarum</i> após simulação de digestão gastrointestinal dos leites fermentados e armazenados por 1, 14 e 28 dias.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACC	American Association of Cereal Chemists
ABTS	Radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association oficial analytical
BSA	Albumina de soro bovino
CIELAB	Comissão Internacional da Iluminação
FOS	Frutooligossarídeos
FRAP	Método de potência antioxidante-redutora férrica
HCL	Ácido clorídrico
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
LAB	Bactérias ácido lácticas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MRS	De Man Rogosa & Sharpe
M9	Minimal Salts
NaOH	Hidróxido de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TSA	Agar Triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade formadoras de colônia
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	LEITE	15
3.2	YACON	15
3.3	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	19
3.4	PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS	20
3.5	SOBREVIVÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL	23
3.6	PEPTÍDEOS BIOATIVOS	24
3.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL	27
4.2	MÉTODOS	27
4.2.1	Obtenção da Farinha de Yacon	27
4.2.2	Composição Centesimal da Farinha de Yacon	27
4.2.3	Potencial Prebiótico da Farinha de Yacon	27
4.2.4	Desenvolvimento de Leite Fermentado com Farinha de Yacon	28
4.2.4.1	Obtenção do pré-inóculo	28
4.2.4.2	Formulação da bebida fermentada	29
4.2.4.3	Curva de crescimento	29
4.2.4.3.1	<i>Contagem dos microrganismos</i>	30
4.2.4.3.2	<i>Seleção do tempo de fermentação</i>	30
4.2.4.4	Caracterização das bebidas fermentadas	30
4.2.4.4.1	<i>Composição centesimal das bebidas selecionadas</i>	30
4.2.4.4.2	<i>Análise de cor instrumental</i>	30
4.2.5	Avaliação da Estabilidade dos Microrganismos Durante o Armazenamento das Bebidas Fermentadas	31
4.2.5.1	Viabilidade celular durante o armazenamento	31

4.2.5.2	Simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal	31
4.2.6	Avaliação <i>in vitro</i> de Propriedades Bioativas das Bebidas Fermentadas	32
4.2.6.1	Capacidade de sequestro de radical livre estável (ABTS)	32
4.2.6.2	Redução de íons de ferro (FRAP)	32
4.2.6.3	Determinação de proteínas solúveis	33
4.2.6.4	Avaliação qualitativa das proteínas	33
4.2.7	Análise Estatística	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DE YACON	35
5.1.1	Potencial Prebiótico da Farinha de Yacon	36
5.2	DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO COM FARINHA DE YACON	38
5.2.1	Curva de Crescimento	38
5.2.2	Composição Centesimal das Formulações de Bebida Fermentada	41
5.2.3	Análise de Cor Instrumental	43
5.2.4	Avaliação da Estabilidade no Armazenamento	45
5.3	SIMULAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL	47
5.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PROPRIEDADES BIOATIVAS DAS BEBIDAS FERMENTADAS	51
5.4.1	Capacidade Antioxidante	51
5.4.2	Avaliação da Hidrólise das Proteínas Presentes nas Bebidas	57
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Leites fermentados são consumidos há centenas de anos e além de uma opção para preservar o leite, seu consumo sempre foi associado à melhora da saúde. São alimentos ricos em proteínas, vitaminas e minerais e ótimos veículos para a incorporação de probióticos (SAVAIANO; HUTKINS, 2021).

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde quando consumidos em quantidades adequadas. Espécies do gênero *Lactobacillus* spp. são alguns dos probióticos mais utilizados em alimentos, principalmente em produtos lácteos (PANDEY et al., 2015). Os probióticos precisam sobreviver à passagem dos alimentos pelo trato gastrointestinal, para chegar ao colón em quantidade suficiente para a colonização do lúmen intestinal, onde irão atuar. E a ingestão simultânea com prebióticos pode aumentar a viabilidade dos microrganismos durante a digestão (LEONE et al., 2017).

Os prebióticos são substratos não digeríveis pela ação do trato gastrointestinal humano, mas que conferem benefícios a saúde do consumidor ao serem fermentados por parte seletiva da microbiota intestinal. Os frutooligossarídeos (FOS) são um dos grupos de prebióticos mais frequentemente presentes nos alimentos (PANDEY et al., 2015).

O yacon é uma planta nativa da região dos andes, mas se adaptou com facilidade à diferentes regiões e climas. Suas raízes de sabor adocicado são constituídas principalmente por água e FOS. O alto conteúdo de FOS incentivou diversos estudos quanto aos benefícios à saúde associados ao seu consumo, entre eles a diminuição do índice glicêmico, a potencial atividade antioxidante e a promoção da proliferação de microrganismos probióticos a partir da fermentação dos FOS (CAETANO et al., 2016).

A fermentação aumenta a vida útil do leite, além de melhorar seus atributos sensoriais e induzir à síntese de metabólitos com potencial atividade fisiológica (HILL et al., 2018). Por exemplo, durante a fermentação e digestão, as proteínas do leite são clivadas em estruturas menores, algumas com a capacidade de atuar fisiologicamente, chamados peptídeos bioativos, que podem ter diversas ações, incluindo imunomodulatória, anti-hipertensiva e antioxidante (TONOLO et al., 2018).

As reações metabólicas que o corpo humano realiza geram radicais livres, que são inibidos e controlados pelo sistema de defesa antioxidante, porém uma produção

excessiva de radicais livres pode causar desequilíbrio nesse sistema. A ingestão de alimentos com compostos antioxidantes pode ajudar a manter o equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes e auxilia na prevenção de patologias desencadeadas pelo estresse oxidativo (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Considerando o potencial efeito prebiótico da raiz de yacon e os benefícios à saúde dos leites fermentados por probióticos, este trabalho objetivou avaliar a incorporação da farinha da raiz de yacon em leite e sua fermentação por *L. casei* e *L. plantarum* para verificar a sobrevivência bacteriana e capacidade antioxidante da bebida, antes e após a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir bebidas lácteas fermentadas separadamente por *L. casei* e *L. plantarum*, adicionadas de diferentes concentrações de yacon e analisá-las quanto à sobrevivência bacteriana e atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar a farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e analisar seu potencial prebiótico.
- Avaliar a fermentação do leite por *L. casei* e *L. plantarum* com diferentes concentrações de farinha de yacon, determinar o tempo de fermentação e caracterizar as bebidas.
- Avaliar a viabilidade de *L. casei* e *L. plantarum* no leite fermentado com yacon e a atividade antioxidante das bebidas durante o armazenamento por 28 dias, antes e após simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*.
- Verificar a influência da digestão *in vitro* na hidrólise das proteínas das bebidas fermentadas com yacon.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITE

O leite é uma emulsão natural, com uma fase líquida aquosa e partículas oleosas em suspensão. O leite mais consumido mundialmente é o leite de vaca, que é composto por lactose (4,9%), lipídeos (3,5%), proteínas (3,3%), minerais (0,7%) e vitaminas. A porção proteica é constituída por aproximadamente 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, que são globulares e hidrofóbicas. As duas principais proteínas que compõem as proteínas do soro são α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, enquanto a caseína é composta principalmente por quatro proteínas: α 1-, α 2-, β - e κ -caseína (BRASIL, et al. 2015).

No leite, as caseínas estão presentes predominantemente como micelas, partículas coloidais, responsáveis por certas características tecnológicas interessantes, como a estabilidade térmica, a coagulação pelo coalho, a cor branca e a textura de produtos como o queijo e iogurte (BRASIL, et al. 2015).

As proteínas do leite ajudam a suprir grande parte dos aminoácidos indispensáveis à dieta humana, influenciam a secreção de insulina e ajudam a suprimir a liberação pós-prandial de glicose, diminuindo a ocorrência de picos glicêmicos, que são um dos fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (MCGREGOR; POPPITT, 2013).

O leite é um alimento versátil, pois pode ser utilizado como base para a produção de vários outros alimentos, além de ser uma importante fonte de nutrientes como carboidratos, minerais, vitaminas e proteínas (CHOI et al., 2012). Consumido a centenas de anos, os leites fermentados foram um dos primeiros alimentos processados na história, a fermentação ajuda na preservação dos nutrientes, retarda a deterioração do alimento e seu consumo está associado a diversos efeitos benéficos à saúde, com ações no trato gastrointestinal, metabolismo e sistema cardiovascular (SAVAIANO; HUTKINS, 2021).

3.2 YACON

Yacon é o nome utilizado para a planta e a raiz de reserva da espécie *Smilax sonchifolius*, a raiz começou a ser cultivada no Brasil no início dos anos

90, pois apesar de ter origem na região dos Andes, o yacon se adapta bem em diferentes condições climáticas, diversos tipos de solo, variadas altitudes e tem boa resistência em períodos de seca (SANTANA; CARDOSO, 2008).

Por ter uma raiz espessa onde ficam acumuladas substâncias de reserva, o yacon é classificado pela botânica como uma raiz tuberosa (Figura 1). Cenoura, mandioca, batata doce e beterraba são outros alimentos com essa classificação, mas apesar de ser um tubérculo, o yacon é tradicionalmente comercializado como fruta, devido ao seu sabor adocicado (SANTANA; CARDOSO, 2008).

Figura 1- Raiz de yacon



Fonte: Territorial seed (2019)

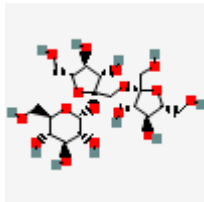
O sabor da raiz do yacon é descrito como semelhante ao do melão e para aumentar a doçura, as raízes colhidas podem ser expostas à luz solar e podem ser consumidas cruas, fritas ou após cocção em vapor (PEDRESCHI et al., 2003). Segundo Cardoso e Santana (2008), apesar da raiz do yacon ser mais comumente consumida na sua forma *in natura*, ela também pode ser utilizada na produção de pães, xaropes, sucos e bebidas fermentadas. Quando comercializado na forma de suco, o yacon pode ser misturado com frutas cítricas, que ajudam na prevenção do escurecimento enzimático. O xarope de yacon pode ser utilizado em receitas como

substituto da sacarose, nas quais também garante uma textura mais leve que facilita a mastigabilidade do produto (DELGADO et al., 2013).

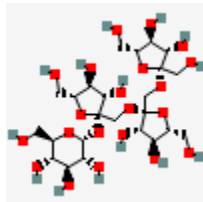
No yacon, os carboidratos são armazenados principalmente como frutooligossacarídeos (FOS), frutanos de baixo grau de polimerização, o que é vantajoso para a indústria alimentícia pois são estáveis a temperaturas de até 140 °C, e resistem a grande parte dos processamentos térmicos industriais. Entretanto após a colheita, os FOS são rapidamente hidrolisados por ação enzimática e, com cerca de 7 dias de armazenamento, aproximadamente 30% dos FOS já são convertidos em açúcares simples, por atuação da enzima frutano hidrolase, que realiza a despolimerização da cadeia entre os resíduos de frutano, levando à liberação de sacarose. Em seguida, a enzima invertase causa a quebra da sacarose, que resulta na liberação de frutose e glicose (SANTANA; CARDOSO, 2008).

Os principais FOS encontrados na raiz de yacon são kestose, nistose e 1-fructofuranosil nistose (Figura 2). Além de FOS, outros carboidratos que compõem o yacon são glicose, frutose, sacarose e traços de amido e inulina. (DELGADO et al., 2013).

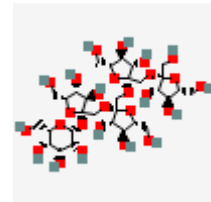
Figura 2 – Frutooligossacarídeos presentes na raiz de yacon



A- Ketose



B- Nystose



C-Fructofuranosyl nystose

Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database (2020).

A raiz de yacon tem baixo valor calórico e alta quantidade de água, que compõe aproximadamente 85% do peso fresco, essa característica afeta sua vida útil, pois aumenta a susceptibilidade à rompimentos, rachaduras e ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. A composição dos carboidratos presentes na raiz de yacon sofre grandes variações devido a fatores como a época de cultivo e colheita, o clima e o cultivar (SANTANA; CARDOSO, 2008). Dependendo das condições de plantio e colheita, a composição de FOS na matéria seca de yacon pode passar de 60% (DELGADO et al., 2013). As concentrações de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais no yacon são relativamente baixas (Tabela 1) e o yacon ainda possui

quantidades consideráveis de compostos fenólicos, que possuem atividade antioxidante e quelante (PIZETTA, 2013).

Na camada logo abaixo da casca do yacon são encontradas as maiores concentrações de taninos e polifenóis que durante o descascamento podem ser oxidados por enzimas citoplasmáticas que são liberadas com o rompimento das membranas celulares, levando ao rápido escurecimento do tecido. Para tentar prevenir o escurecimento enzimático no yacon, podem ser utilizados antioxidantes e métodos de desidratação e armazenamento à baixas temperaturas, o que também ajudam na preservação das concentrações de FOS (SANTANA; CARDOSO, 2008).

Tabela 1 – Composição média do yacon (g/ 100g)

Componentes	Base seca
Carboidratos	73,80
Fibras	4,81
Proteínas	5,35
Lipídeos	0,55
Cinzas	5,88
Potássio	1,79
Fósforo	0,18
Cálcio	0,06
Magnésio	0,05
Sódio	0,002
Ferro	0,001
Vitamina B1	0,0004
Vitamina B2	0,002
Vitamina C	0,03
β- caroteno	0,0007
Polifenóis	1,09

Fonte: Adaptado de LACHMAN; FERNANDEZ; ORSAK, 2003 apud PIZETTA, 2013

Um método para prevenir o escurecimento do yacon catalisado pelas enzimas peroxidase e polifenoloxidase é a produção de farinha, pois a ação do calor promove a desativação das enzimas e não causa a degradação dos FOS (PIZETTA, 2013).

Com a descoberta de certas características nutricionais e promotoras de saúde, o consumo da raiz de yacon passou a aumentar nas últimas décadas, principalmente devido ao potencial como alimento prebiótico (MANZONI et al., 2012).

Os estudos de Pedreschi et al. (2003) sugerem que o yacon em um produto probiótico pode ajudar na manutenção da viabilidade celular durante o processamento e digestão do alimento. Seus resultados demonstram que os FOS de yacon são

utilizados pelas cepas de lactobacilos estudadas e que, portanto, a raiz pode ser considerada uma potencial fonte prebiótica. Leone et al. (2017) também demonstraram que o yacon tem a capacidade de agir como protetor das células bacterianas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, aumentando a taxa de sobrevivência dos probióticos.

As bifidobactérias e alguns lactobacilos demonstraram ser capazes de metabolizar os componentes presentes na raiz de yacon, promovendo seu crescimento e produção de ácidos graxos de cadeia curta. A farinha de yacon pode ser utilizada como prebiótico ao ser metabolizada e estimular o crescimento de microrganismos probióticos (SOUSA et al., 2015), como demonstrado nos trabalhos de Rolim et al. (2011) que produziram pão prebiótico com farinha de yacon e Manzoni et al. (2012) que desenvolveram uma bebida simbiótica utilizando extrato de soja e yacon.

3.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias ácido lácticas (LAB) são amplamente utilizadas na fermentação de alimentos devido a seu status de segurança GRAS (*Generally recognized as safe*) (WIDYASTUTI; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, 2014). São bactérias gram-positivas e de acordo com seus produtos de fermentação podem ser divididas em duas categorias: as heterofermentativas que produzem ácido láctico, ácido acético e CO₂, e as homofermentativas que convertem os carboidratos principalmente em lactato (SWAIN et al., 2014). O lactato é um hidróxiácido graxo de cadeia curta que pode ser convertido em ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato por algumas cepas bacterianas (IRAPORDA et al., 2015).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. são encontradas em frutas, vegetais, produtos naturalmente fermentados e no trato gastrointestinal de humanos e animais (HILL et al., 2018). Alguns lactobacilos probióticos são capazes de fermentar prebióticos, devido aos diferentes sistemas enzimáticos do gênero, alguns probióticos possuem glicosidases capazes de quebrar as moléculas de oligossacarídeos dos prebióticos em monossacarídeos que são então utilizados pelo microrganismo. E certas cepas de *L. plantarum* também possuem sistemas de transporte específicos para oligossacarídeos, que permite sua absorção e metabolização interna (SARBINI; RASTALL, 2011).

Para a fermentação de frutas e vegetais o *Lactobacillus plantarum* é a espécie mais utilizada (SWAIN et al., 2014), além de metabolizar compostos com atividade antioxidante, o *L. plantarum* é associado à redução em processos inflamatórios devido a sua atuação no intestino grosso e no sistema imune (HANG et al., 2020).

O amplo uso de *L. casei* na indústria alimentícia se deve ao seu potencial tecnológico na melhoria do sabor e textura de produtos fermentados e aos benefícios à saúde que são conferidos aos produtos fermentados pela espécie, como a síntese de metabólitos com bioatividade e a manutenção da microbiota intestinal (HILL et al., 2018).

As LAB ao fermentarem os alimentos melhoram seus atributos sensoriais, aumentam a segurança alimentar e trazem benefícios à saúde (WIDYASTUTI; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, 2014). A fermentação é um processo que utiliza microrganismos para converter os carboidratos presentes no alimento em álcoois e ácidos orgânicos (SWAIN et al., 2014), sendo o leite é a principal matéria-prima fermentada por LAB.

As LAB realizam a hidrólise dos carboidratos do leite que leva a formação de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, que contribui para o desenvolvimento de sabor e textura caraterísticos de produtos lácteos fermentados (WIDYASTUTI; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, 2014).

Os metabólitos formados pela fermentação dos carboidratos levam a acidificação do meio e quando o pH do leite se aproxima de 4,7 ocorre o processo de agregação das caseínas, que auxilia no desenvolvimento da textura dos leites fermentados (LOPES, et al., 2019).

3.4 PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS

A demanda por alimentos funcionais levou ao aumento no interesse em desenvolver produtos com probióticos e prebióticos devido aos benefícios fisiológicos associados ao seu uso, como a produção de compostos bioativos que ajudam na modulação de sistemas fisiológicos e a melhora da função intestinal (IRAPORDA et al., 2019).

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas garantem benefícios à saúde do hospedeiro. Os gêneros mais utilizados são *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp (BINNS, 2013). As

propriedades de um probiótico ideal são: não ser patogênico, ser geneticamente estável, resistir à passagem pelo trato gastrointestinal e a métodos de processamento, produzir ácido láctico, ter propriedades anti-genotóxicas, desenvolvimento rápido e capacidade de se aderir às células epiteliais do intestino (PANDEY; NAIK; VAKIL 2015).

Foi observado que após o consumo de probióticos ocorre redução nos níveis sanguíneos de triglicerídeos e colesterol LDL. Uma das hipóteses propostas para essa redução é que os probióticos realizam a conversão do colesterol em ácidos biliares, aumentando sua excreção com as fezes. Pesquisas com probióticos têm explorado sua aplicabilidade clínica na manutenção da saúde e prevenção de condições específicas, como aterosclerose e infarto do miocárdio (PANDEY; NAIK; VAKIL 2015).

O consumo regular de probióticos previne a diarreia, a constipação e auxilia a composição da microbiota intestinal, pois os probióticos têm a capacidade de aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que mantêm o pH do lúmen intestinal em condições desfavoráveis à patógenos (KERRY et al., 2018). Os principais ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelos probióticos são o acetato, butirato e propionato, que participam da regulação do sistema imune, do metabolismo e da proliferação celular, agindo como sinalizadores celulares (MAKKI et al., 2018). Estes ácidos graxos de cadeia curta são metabolizados durante a fermentação de substâncias prebióticas por alguns microrganismos presentes do lúmen intestinal (CAETANO et al., 2016). O acetato e o butirato também agem na regulação da secreção de muco, assim como as fibras dos alimentos prebióticos, que estimulam mecanicamente a secreção, portanto, uma dieta com baixa ingestão de fibras pode afetar a barreira protetora do epitélio intestinal e a síntese de ácidos graxos de cadeia curta (MAKKI et al., 2018).

Nos anos 1980 os oligossacarídeos fermentáveis começaram a ganhar a atenção dos pesquisadores, devido a estimulação que proporcionam no crescimento de alguns microrganismos e em 1995 foi definido que estes “prebióticos” são substâncias capazes de modular a microbiota intestinal. Em 2010 foi definido que prebióticos são ingredientes seletivamente fermentados, que resultam em alterações específicas na composição ou atividade da microbiota gastrointestinal, assim proporcionando benefícios para a saúde do hospedeiro (BINNS, 2013). Em 2016, essa definição foi atualizada para “um substrato que é seletivamente utilizado pelos microrganismos e confere benefícios à saúde do hospedeiro” pela Associação

Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (QUIGLEY, 2019). Os oligossacarídeos e polissacarídeos de frutose chamados FOS e inulina, respectivamente, são alguns dos prebióticos mais utilizados em alimentos simbióticos (PANDEY; NAIK; VAKIL 2015).

A ingestão frequente de prebióticos está associada a regulação de doenças metabólicas, a modulação do sistema imune, ao aumento na absorção de minerais e principalmente ao aumento na proliferação de probióticos no cólon (SOUSA et al., 2015). Como os prebióticos são em sua maioria carboidratos não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, eles podem ser classificados como fibras (QUIGLEY, 2019).

Apesar das fibras com ação prebiótica serem encontradas em vegetais, legumes, frutas e cereais, seu consumo é baixo pela população em geral. Incorporar ingredientes ricos em fibras em alimentos do consumo diário é uma estratégia para aumentar sua ingestão. Pois, uma dieta com baixa ingestão de fibras pode afetar a composição da microbiota intestinal e a desregulação desse equilíbrio pode levar a problemas inflamatórios e desencadear condições crônicas, alérgicas e autoimunes. As fibras alteram a microbiota presente no cólon, permitindo que as espécies microbianas que são capazes de utilizar substratos prebióticos expandam suas populações (MAKKI et al., 2018).

A habilidade de uma bactéria se beneficiar do consumo de fibras com atividade prebiótica depende de diversos fatores, entre eles a capacidade de degradação do substrato pelas enzimas bacterianas, de adaptação as mudanças do meio e de utilização dos metabólitos secundários para seu próprio benefício (MAKKI et al., 2018). Como a habilidade do probiótico em metabolizar o prebiótico varia de acordo com a cepa e o substrato, novas combinações de probióticos e prebióticos devem ser avaliadas quanto à capacidade de utilização do substrato (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2019).

Simbióticos são alimentos que possuem prebióticos e probióticos em sua composição, juntos eles podem agir sinergicamente, potencializando os efeitos benéficos à saúde do consumidor, estimulando a proliferação seletiva da microbiota do trato gastrointestinal, diminuindo a adesão de patógenos ao intestino e facilitando a absorção de nutrientes (OLIVEIRA, 2008). Com o crescente interesse comercial em alimentos saudáveis e acessíveis, a tendência é que alimentos simbióticos estejam cada vez mais presentes nas refeições diárias da população (KERRY et al., 2018).

Para exercer seus efeitos os probióticos precisam sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e chegar ao cólon em quantidades adequadas para a colonização, essa resistência deve ser um fator importante na escolha do probiótico (IRAPORDA et al., 2019). Simbióticos auxiliam a sobrevivência dos probióticos em condições de estresse para a célula bacteriana, conseqüentemente aumentando suas chances de colonização (PANDEY; NAIK; VAKIL 2015).

3.5 SOBREVIVÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL

Mais de 400 espécies de microrganismos constituem a microbiota intestinal e o cólon é a parte do intestino grosso com a maior população de microrganismos colonizadores, que pode chegar a 10^{11} organismos por mililitro (BINNS, 2013).

A dieta pode interferir na composição da microbiota intestinal e os prebióticos são uma boa opção de alimentos funcionais que influenciam a microbiota por serem fermentados por algumas espécies de microrganismos colonizadores do intestino, levando a uma melhora na saúde e bem-estar do consumidor (SARBINI; RASTALL, 2011). Os FOS, por exemplo, são fermentados por microrganismos específicos, geralmente lactobacilos e bifidobacterias e sua fermentação gera metabolitos que suprimem o desenvolvimento de patógenos (SARBINI; RASTALL, 2011).

Para exercerem seus efeitos e colonizar o cólon, os probióticos presentes nos alimentos precisam se manter viáveis durante todo o período de armazenamento do produto e sobreviver à acidez, aos sais biliares e às enzimas do trato gastrointestinal, portanto, é recomendado que no momento da ingestão, a contagem de células viáveis do probiótico no produto encontre-se entre 10^6 e 10^8 UFC/g (LEONE et al., 2017). Como uma considerável perda na viabilidade dos probióticos é esperada no percurso pelo trato gastrointestinal devido às mudanças de pH e enzimas presentes, diferentes abordagens vêm sendo estudadas para melhorar a resistência dos probióticos e minimizar esta perda (SUCCI et al., 2017).

Os prebióticos podem aumentar a tolerância das células bacterianas às condições estressantes e assim aumentar a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento do produto e durante a sua ingestão (ZHANG, et al., 2019). Embora os mecanismos da proteção dos prebióticos na viabilidade das células bacterianas ainda não tenham sido completamente elucidados (SUCCI et al., 2017), já foi sugerido que os prebióticos, por não serem hidrolisados nas condições do trato gastrointestinal,

agem como uma barreira física protegendo os probióticos das mudanças de pH e secreção das enzimas gástricas, além de poderem ser utilizados pelo microrganismo durante o armazenamento e no epitélio intestinal, auxiliando na manutenção celular (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010).

Apesar das análises de simulação gástrica não mimetizarem perfeitamente a passagem do alimento pelo trato gastrointestinal, avaliar a resistência dos probióticos presentes no alimento frente às enzimas gástricas e sais biliares é uma estratégia válida para selecionar a combinação de microrganismo e matriz alimentar mais propícia a garantir a viabilidade das células bacterianas (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010).

3.6 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Durante o processamento do leite, como na fermentação ou na digestão, as caseínas e as proteínas do soro são hidrolisadas e liberam proteínas de menor tamanho molecular, peptídeos e aminoácidos. Alguns destes peptídeos podem atuar no sistema cardiovascular, ter ação antimicrobiana e antioxidante. Por agir fisiologicamente, estas moléculas são chamadas de peptídeos bioativos (TONOLO et al., 2018).

Matar et al. (1996) demonstraram que a fermentação do leite por lactobacilos influencia o perfil de liberação de aminoácidos e peptídeos durante a digestão por aumentar a exposição das sequências peptídicas, deixando-as mais propícias à hidrólise pelas enzimas gástricas. O sistema enzimático das LAB, composto por proteases e peptidases, também pode levar a formação de peptídeos bioativos a partir da hidrólise das proteínas do leite (WIDYASTUTI; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, 2014). A habilidade de produzir peptídeos com atributos fisiológicos de algumas LAB como *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* é interessante tecnologicamente, pois estes microrganismos já são utilizados como probióticos em produtos lácteos e ao sintetizar estes peptídeos podem contribuir para a prevenção de condições crônicas, agindo diretamente na fisiopatologia da doença ou diminuindo o estresse oxidativo (SOLIERI; RUTTELA; TAGLIAZUCCHI, 2015).

Os peptídeos bioativos produzidos a partir das proteínas do leite podem diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio e proteger as células do estresse

oxidativo, ao capturar radicais livres e agir como quelantes de metais (TONOLO et al., 2018).

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com o aumento na procura por alimentos mais saudáveis, as características nutricionais do yacon têm ganhado a atenção dos consumidores (CAETANO et al., 2016) e o desenvolvimento de fermentados lácteos com extratos vegetais é uma tendência cada vez mais popular (HANG et al., 2020). Estes alimentos fermentados podem apresentar atividade antioxidante, ajudando no combate aos radicais livres, devido aos compostos liberados durante o metabolismo probiótico, como os peptídeos provenientes das proteínas do leite (SOLIERI; RUTTELA; TAGLIAZUCCHI, 2015).

Os radicais livres são produzidos normalmente nas reações bioquímicas do organismo, onde agem como moléculas de defesa e de sinalização celular. Porém o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio ou a diminuição da defesa antioxidante levam ao estresse oxidativo, que é definido como a incapacidade dos antioxidantes endógenos em neutralizar o dano oxidativo em alvos biológicos, e pode ser o gatilho que desencadeia condições como doenças cardiovasculares ou neurodegenerativas (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Antioxidantes são substâncias que atrasam, previnem ou removem o dano oxidativo de uma molécula, neutralizando radicais livres. A reação $AH + FR\cdot \rightarrow A\cdot + FRH$ (onde AH representa o antioxidante, $FR\cdot$ o radical livre e $A\cdot$ representa um radical livre secundário menos reativo), exemplifica a base do mecanismo de ação clássico dos antioxidantes, na qual o antioxidante doa um hidrogênio para o radical livre, tornando-o uma molécula mais estável (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Os antioxidantes não são a cura para as doenças associadas ao estresse oxidativo, pois elas são multifatoriais e o estresse oxidativo é apenas um destes fatores, mas os antioxidantes podem ajudar a manter o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, evitando que o excesso de radicais livres leve ao desencadeamento destas doenças, agindo na prevenção. Alimentos que possuem quantidades consideráveis de substâncias com potencial antioxidante foram sugeridos como uma opção de fortificar a defesa antioxidante do organismo e assim ajudar na prevenção de condições fisiopatológicas crônicas (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Ingerir alimentos ricos em antioxidantes pode ser mais benéfico, além de mais econômico do que o consumo da substância isolada, uma vez que a combinação de variados tipos de antioxidantes, como encontrado frutas e fermentados, é mais eficaz a longo prazo (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Devido à complexidade do sistema de defesa antioxidante, um único método *in vitro* não é capaz de simular os mecanismos de ação que ocorrem no organismo, por isso é comum utilizar mais de um princípio metodológico ao avaliar a capacidade antioxidante para obter diferentes informações sobre a interação dos radicais livres presentes na matriz avaliada e estimar a capacidade antioxidante das substâncias e como interagem com os radicais livres. Alguns dos métodos *in vitro* mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante são o poder de redução do íon ferro (FRAP) e a captura do radical ABTS (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

O método de potência antioxidante-redutora férrica (FRAP) avalia a capacidade dos antioxidantes de reduzirem o complexo férrico e baseia-se na redução do complexo férrico-TPTZ para sua forma ferrosa em pH ácido. Essa redução é monitorada pela mudança na absorção a 593 nm que é correlacionada à atividade antioxidante do composto (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

O método que utiliza o radical ABTS baseia-se na reação colorimétrica, que ocorre quando o nitrogênio da molécula ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)*) perde um elétron e o radical ABTS•+ é formado. Esse radical possui uma coloração esverdeada que absorve em 743 nm. Na presença de algum antioxidante doador de hidrogênio, o nitrogênio do radical ABTS•+ captura o hidrogênio, causando a descoloração da solução esverdeada e diminuição na absorbância (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011).

Ao avaliar a capacidade antioxidante de formulações de leite com yacon fermentado por *L. casei* e *L. plantarum* é possível determinar a influência da presença da farinha de yacon e da digestão no sequestro de radicais livres. Além disso, também é possível avaliar a influência do yacon na viabilidade das células bacterianas durante o armazenamento e digestão das bebidas. O uso da farinha de yacon como ingrediente na produção de alimentos fermentados pode incentivar o aumento do consumo de fibras prebióticas e probióticos, auxiliando a promoção da saúde a partir de uma melhora na dieta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) e as raízes de yacon recém colhidas foram adquiridas no comércio local em Londrina – PR.

Foram utilizadas culturas probióticas liofilizadas de *Lactobacillus casei* (LC-01), (Christian Hansen) e *Lactobacillus plantarum* (BG-112) (Clerici-Sacco), ativadas a 37 °C por 18 h em condições aeróbias em leite reconstituído a 10 % (m/v) estéril.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção da Farinha de Yacon

A farinha de yacon foi obtida como descrito por Pizetta (2013). As raízes de yacon foram lavadas em água corrente e depois imersas em água clorada (200 ppm). Em seguida foram descascadas, fatiadas com aproximadamente 5 mm de espessura e imersas em solução contendo 0,05% de ácido cítrico e 0,05% de ácido ascórbico. Depois foram colocadas em bandejas de aço inoxidável e secas por 24 h a 60 °C em estufa com circulação de ar (TE – 394/2, Tecnal, Brasil). Então o yacon desidratado foi triturado em moinho de bancada e peneirado a 0,250 mm para a obtenção da farinha, que foi armazenada em sacos de polietileno em local seco em temperatura de refrigeração (6 °C ± 2 °C).

4.2.2 Composição Centesimal da Farinha de Yacon

A farinha de yacon foi caracterizada quanto a sua composição centesimal seguindo metodologia oficial da AACC (2000): (i) umidade – nº 44-15A; (ii) lipídeos – nº 30-10; (iii) proteínas – nº 46-13; (iv) cinzas – nº 08-10; (vi) carboidratos – por diferença e teor de fibras foi determinado segundo o método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2019).

4.2.3 Potencial Probiótico da Farinha de Yacon

A habilidade de alguns microrganismos probióticos em utilizar os carboidratos presentes na farinha de yacon foi avaliada comparando o crescimento em meio DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) sem glicose com adição da farinha de yacon, em meio MRS com glicose (controle positivo) e em meio MRS sem glicose (controle negativo), como descrito por Iraporda et al. (2019). Desta forma, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. reuteri* foram ativados por 2 repiques sucessivos em caldo MRS realizados a cada 24 h e depois foram incubados em meio MRS por 48 h a 37 °C. Uma colônia de cada microrganismo ativado foi inoculada separadamente em 10 mL de caldo MRS por 12 h e em seguida 1% (v/v) de cada cultura foi inoculada em caldo MRS sem glicose, caldo MRS com 2% (m/v) de farinha de yacon e caldo MRS com 2% (m/v) de glicose. As culturas foram incubadas por 24 h. Para a contagem, foram realizadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1% (m/v) e os microrganismos probióticos foram inoculados em meio MRS com 2% (v/v) de farinha de yacon ou glicose e em meio MRS sem fonte de carbono (controle negativo). Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e os resultados foram expressos em UFC/mL.

Para determinar se a raiz yacon pode induzir também o crescimento de bactérias patogênicas, o crescimento de uma cultura de *E. coli* foi avaliada em meio com farinha de yacon como descrito por Huebner et al. (2008). Para isso, a cepa de *E. coli* foi ativada em meio TSA e incubada a 37 °C por 48 h, então uma colônia foi transferida para o caldo TSB e incubada a 37 °C por 12 h. 1% da cultura foi inoculada em caldo M9 com 2% (m/v) de yacon e em caldo M9 sem fonte de carbono e foram incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida, foram diluídas e plaqueadas em ágar TSA com 2% de yacon e ágar TSA sem fonte de carbono.

4.2.4 Desenvolvimento de Leite Fermentado com Farinha de Yacon

4.2.4.1 Obtenção do pré-inóculo

Como descrito por Souza et al. (2011), as culturas liofilizadas de *L. casei* (LC-01) e *L. plantarum* (BG-112) foram ativadas em uma solução de leite desnatado em pó (10% m/v) e cultivadas a 37 °C durante 18 h (fase estacionária). Depois, 1% (v/v) da cultura foi inoculado novamente em uma solução de leite desnatado em pó (10% m/v) e foram cultivadas a 37 °C durante 18 h. Para o processo fermentativo e

realização das análises, 1% (v/v) deste pré-inóculo foi adicionado à formulação de leite com yacon.

4.2.4.2 Formulação da bebida fermentada

Neste trabalho, foram utilizadas as concentrações de 0% (controle), 3%, 6% e 9% (m/v) de farinha de yacon para as formulações de leite fermentado (Tabela 2). A concentração inicial foi baseada nos estudos de Pizetta (2013) e Vasconcelos (2010), os quais utilizaram concentrações entre 1,58% e 3,86% de farinha de yacon para produção de iogurtes. Para a fermentação do leite foram utilizados separadamente dois microrganismos fermentadores (*L. plantarum* ou *L. casei*) na concentração de 1% (v/v) à 37 °C.

Tabela 2 - Formulações das bebidas fermentadas adicionadas de farinha de yacon e microrganismos

Formulação	Microrganismo (1%)	Farinha de yacon
1	<i>L. casei</i>	0%
2	<i>L. casei</i>	3%
3	<i>L. casei</i>	6%
4	<i>L. casei</i>	9%
5	<i>L. plantarum</i>	0%
6	<i>L. plantarum</i>	3%
7	<i>L. plantarum</i>	6%
8	<i>L. plantarum</i>	9%

Fonte: O próprio autor

4.2.4.3 Curva de crescimento

Foram realizadas curvas de crescimento de acordo com Souza et al. (2011) para as 8 formulações descritas na Tabela 2. Para isso, 1% (v/v) do pré-inóculo foi transferido para a formulação desejada e o crescimento foi acompanhado por 24 h à 37 °C. Amostras foram retiradas a cada 4 h, seguida de análise de pH e contagem de placas em triplicata.

4.2.4.3.1 *Contagem dos microrganismos*

Para a contagem dos microrganismos, 10 mL das amostras de leite fermentado foram homogeneizadas em 90 mL de água peptonada 0,1% (m/v) estéril, seguida de diluições seriadas e plaqueamento por profundidade com ágar MRS (Oxoid, Brasil). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h em aerobiose. Os resultados estão expressos como log de unidades formadoras de colônias por mL de amostra (log UFC/mL).

4.2.4.3.2 *Seleção do tempo de fermentação*

A partir dos resultados de contagem de log UFC/mL e análise de pH obtidos pelas curvas de crescimento, foi determinado que o tempo de fermentação para as bebidas fermentadas por *L. casei* seria de 20 h e para as bebidas fermentadas por *L. plantarum* seria de 16 h.

4.2.4.4 *Caracterização das bebidas fermentadas*

4.2.4.4.1 *Composição centesimal das bebidas selecionadas*

A avaliação da composição centesimal foi realizada nas bebidas com 0, 3, 6 e 9% (v/v) de farinha de yacon fermentados por *L. casei* por 20 h a 37 °C e nas bebidas com 0, 3, 6 e 9% (m/v) de farinha de yacon fermentadas por *L. plantarum* por 16 h a 37 °C seguindo as metodologias descritas pela AOAC (2019). Foram determinados os teores de proteínas, lipídios, cinzas e sólidos totais. O teor de carboidratos foi determinado por diferença.

4.2.4.4.2 *Análise de cor instrumental*

A cor instrumental foi avaliada nas 8 bebidas fermentadas e na farinha de yacon, utilizando um colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc.) com iluminante D65. Os valores de L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema CIELAB.

4.2.5 Avaliação da Estabilidade dos Microrganismos Durante o Armazenamento das Bebidas Fermentadas

As bebidas fermentadas foram preparadas de acordo com o exposto nos itens 4.2.4.1 e 4.2.4.2 e armazenadas em tubos de polipropileno de 50 mL esterilizados e conservadas à $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob o abrigo da luz. As análises de pH e viabilidade celular, antes e após a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal, foram realizadas em triplicata nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento.

4.2.5.1 Viabilidade celular durante o armazenamento

A viabilidade celular das formulações foi determinada como descrito em 4.2.4.3.1, antes e após simulação da digestão gastrointestinal nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento refrigerado ($6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) sob abrigo da luz.

4.2.5.2 Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

A análise foi realizada segundo a metodologia descrita por Bedani et al. (2014). Primeiro, 25 mL de amostra foram adicionados a 225 mL de solução salina 0,85 %, o pH foi ajustado entre 2,3 – 2,6 com solução de HCL 1 M e foram adicionadas as enzimas pepsina e lipase na concentração de 3 g/L e 0,9 mg/L, respectivamente. Depois, as amostras foram incubados por 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente plaqueadas em meio MRS e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após as primeiras 2 h de digestão, o pH da amostra foi ajustado para 5,4– 5,7 com solução alcalina (150 mL de NaOH 1 N + 14 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e adição da solução de bile e pancreatina para atingir as concentrações na amostra de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente, mantendo-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por mais 2 h, seguido do plaqueamento em meio MRS. A seguir, o pH foi ajustado para 6,8 – 7,2 com a solução alcalina e foi novamente adicionada a solução de bile e pancreatina, mantendo-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h, seguida de plaqueamento em meio MRS, completando assim as 6 h de simulação do trato gastrointestinal. Os resultados foram expressos em log UFC /mL de amostra e a porcentagem de sobrevivência foi calculada conforme Equação 1.

Equação 1:

$$\% \text{ de sobrevivência} = \frac{\text{Log de } \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \text{ após a simulação da digestão}}{\text{Log de } \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \text{ antes da simulação da digestão}}$$

4.2.6 Avaliação *in vitro* de Propriedades Bioativas das Bebidas Fermentadas

As bebidas fermentadas foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento, antes e após a simulação da digestão do trato gastrointestinal.

A degradação das proteínas antes e após a simulação gástrica foi avaliada no dia 1 de armazenamento antes e após a simulação da digestão gastrointestinal.

4.2.6.1 Capacidade de sequestro de radical livre estável (ABTS)

Foi utilizado o método de descoloração ABTS conforme descrito por Re et al. (1999). Em água, foi preparada uma solução estoque de ABTS 7 mM, para a produção do cátion ABTS+• (ácido 2,2'-azinobis (3- eilbenzotiazolínico-6- sulfônico). Então, foi realizada uma reação com a solução estoque de ABTS (7 mM) e 2,45 mM de persulfato de potássio em ambiente escuro, por 16 h, a temperatura ambiente. A solução de ABTS+• foi diluída para uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ a 734 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Uma solução de Trolox diluído foi utilizada para a construção da curva analítica ($y = -0,3632x + 0,7438$, $R^2 = 0,9909$) com concentrações de 0,05 mM a 1 mM de Trolox e os resultados da atividade antioxidante foram expressos em equivalente mM de Trolox.

4.2.6.2 Redução de íons de ferro (FRAP)

A avaliação foi realizada de acordo com metodologia descrita por Benzie e Strain (1999). O reagente FRAP foi preparado com a mistura de 2,5 mL de 20 mM cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2,5 mL de uma solução 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em 40 mM HCl e 25 mL de 0,3 mM tampão acetato de pH 3,6. A solução foi incubada a 37 °C por 30 min. Para a reação, uma alíquota de 30 µL de cada amostra, 90 µL de água ultra-pura e 900 µL do reagente FRAP foram misturados em ambiente

escuro e mantidos em banho-maria a 37°C. Após 30 min de reação, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 595 nm. O branco foi preparado com 900 µL do reagente de FRAP e 100 µL de água ultra-pura. Para a construção das curvas analíticas ($y = 0,0006x + 0,1332$, $R^2 = 0,9766$) foram utilizadas soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox (50 a 1200 µM). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em equivalente mM de Trolox.

4.2.6.3 Determinação de proteínas solúveis

Para determinar se ocorrem diferenças na liberação de proteínas solúveis entre as bebidas durante a proteólise, induzida pelas enzimas digestivas, o teor de proteínas solúveis antes e após a simulação da digestão das bebidas foi determinado de acordo com a metodologia de Bradford (1976). O reagente foi preparado com *Coomassie Brilliant Blue* G-250, 50 mL etanol 95% (°GL, v/v) e 100 mL de ácido fosfórico a 85 % (m/m), a solução resultante foi diluída para 1 L, filtrada e armazenada em frasco âmbar envolto em papel alumínio, as concentrações finais no reagente foram 0,01% (m / v) de *Coomassie Brilliant Blue* G-250, 4,7% (m / v) de etanol e 8,5% (m / v) de ácido fosfórico. Uma curva analítica ($y = 0,002x + 0,0792$, $R^2 = 0,9975$) com concentrações de 80 a 400 µg/mL foi preparada a partir de uma solução de BSA (albumina de soro bovino) 1000 µg/mL e a amostra foi diluída de forma que a absorbância ficasse entre 0,2 a 0,6. Depois 0,1 mL da amostra diluída ou solução de BSA foi pipetada e foram adicionados 2 mL de reagente de Bradford a um tubo de ensaio, que foi agitado e após 5 min a leitura foi realizada em 595 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL.

4.2.6.4 Avaliação qualitativa das proteínas

As proteínas presentes no leite e nas formulações de leite fermentado antes e após a simulação da digestão pelo trato gastrointestinal foram avaliadas qualitativamente por eletroforese (SDS-PAGE) para determinar a influência das diferentes concentrações de yacon e da simulação da digestão no trato gastrointestinal no conteúdo de proteínas do leite. As amostras das bebidas foram diluídas (20 mg/mL) em tampão Laemmli com 5% de β-mercaptoetanol (β-ME) e fervidas por 5 min antes da aplicação (15 µL). As bandas de proteínas foram

analisadas por SDS-PAGE com géis de Tris-HCl de 4-20%. O padrão Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA) foi utilizado para comparação dos pesos moleculares e a corrida foi realizada a 120 V, 60 mA por 220 min (LAEMMLI, 1970).

4.2.7 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram avaliados pelo software R (R CORE TEAM, 2019) utilizando análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e o teste t de *Student* ao nível de 5% de significância. Os gráficos foram construídos no software Graphpad Prism 5 e as correlações foram determinadas pela correlação de Pearson.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DE YACON

A farinha de yacon produzida obteve um rendimento de 6,85% (m/m) e umidade de 8,52% (m/m). Este percentual está de acordo com o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, que estabelece umidade máxima permitida de até 15,0% (BRASIL, 2005).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da composição centesimal da farinha de yacon obtida, que é composta por 90 % de carboidratos, dos quais 4,15% e 8,50% são fibras solúveis e insolúveis, respectivamente, em base seca. Esses valores de fibras são similares aos calculados por Pereira et al. (2013) que obteve 13,99% de fibras alimentares totais e por Rolim et al. (2011), que encontrou 2,76% de fibras solúveis e 9,45% de fibras insolúveis na farinha de yacon. A farinha de yacon produzida para este trabalho possui mais do que 6% de fibras alimentares, portanto, ela pode ser considerada um alimento com alto teor de fibras de acordo com o Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar (BRASIL, 2012).

Tabela 3 – Composição centesimal média da farinha de yacon, calculada em base seca.

Proteínas (%)	4,13 ± 0,36
Cinzas (%)	3,88 ± 0,10
Lipídeos (%)	1,95 ± 0,20
Carboidratos totais (%)	90,04 ± 0,37
Fibras solúveis (%)	4,15 ± 0,27
Fibras insolúveis (%)	8,50 ± 0,50

Fonte: o próprio autor

Fibras são carboidratos complexos e podem ser subdivididas em duas categorias, as fibras insolúveis, que em geral não são digeridas pelas bactérias do lúmen

intestinal, mas contribuem com o volume da massa fecal, facilitando o trânsito intestinal, e as fibras solúveis que podem ser fermentadas pela microbiota intestinal. Entre a categoria de solúveis, algumas podem ser também classificadas como prebióticas por favorecem o crescimento no intestino grosso dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que ao fermentarem estes compostos sintetizam ácidos graxos de cadeia curta, que possuem atividade fisiológica benéfica (MAKKI et al., 2018). A farinha produzida neste trabalho possui em sua composição 4,15% (m/m) de fibras solúveis com potencial para serem metabolizadas por microrganismos probióticos, sendo assim um ingrediente interessante para o desenvolvimento de produtos prebióticos e simbióticos.

5.1.1 Potencial Prebiótico da Farinha de Yacon

Prebióticos são compostos não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento de microrganismos no cólon (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015). O potencial prebiótico da farinha de yacon foi avaliado substituindo a glicose do caldo MRS por farinha de yacon e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Crescimento de *L. casei*, *L. plantarum* e *L. reuteri* em caldo MRS com diferentes fontes de carbono e *E. coli* em ágar TSA com e sem farinha yacon. Resultados expressos em log de UFC/mL.

Microrganismo	Meio sem glicose	Meio com glicose	Meio com farinha de yacon
<i>L. casei</i>	7,783±0,11 ^C	9,400±0,10 ^B	9,967±0,05 ^A
<i>L. plantarum</i>	8,120± 0,08 ^C	9,458±0,11 ^A	8,952±0,05 ^B
<i>L. reuteri</i>	7,573±0,08 ^C	11,577±0,05 ^A	10,315±0,02 ^B
<i>E. coli</i>	6,587± 0,02 ^A	NA	6,501±0,08 ^A

^A Medidas seguidas da mesma letra na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{NA} não se aplica ao método.

Os resultados da Tabela 4 mostram que a farinha de yacon foi favorável ao crescimento de todos os lactobacilos avaliados, obtendo altas contagens, com valores acima de 8,5 log UFC/mL.

Esses resultados demonstram que os probióticos analisados conseguem utilizar a farinha de yacon como fonte de energia para se proliferar. Além disso a farinha de yacon não induziu a proliferação do microrganismo patogênico avaliado, *E. coli* (CAETANO et al., 2016), pois não houve diferença significativa no crescimento do patogênico entre o controle negativo e o meio com yacon (Tabela 4). Estes resultados sugerem que a farinha de yacon, ao estimular seletivamente a proliferação dos microrganismos probióticos, é um potencial ingrediente prebiótico, entretanto estudos adicionais utilizando apenas as fibras do yacon são necessários para a comprovação deste efeito.

Em trabalhos similares, ao verificar o efeito prebiótico de outros prebióticos, como inulina e Oligomate, encontraram resultados similares aos obtidos neste estudo. Por exemplo, Figueira-Gonzalez et al. (2018) estudaram o efeito de prebióticos comerciais no crescimento de 5 cepas probióticas e o compararam com o crescimento em meio com lactose. Para a maioria dos tratamentos, não foram encontradas diferenças no crescimento entre as bactérias inoculadas com os prebióticos e as inoculadas no meio com o controle positivo, a lactose, todos os tratamentos apresentaram contagens próximas a 8 log de UFC/mL, após 24h de fermentação. Assim como os resultados obtidos neste trabalho, que apresentaram altas contagens de células viáveis no meio com farinha de yacon e no meio com glicose.

Iraporda et al. (2019), que compararam o crescimento de lactobacilos inoculados em MRS com inulina comercial e com inulina extraída de alcachofra de Jerusalém, além do controle positivo (MRS com glicose) e do controle negativo de (MRS sem nenhuma fonte de carbono), verificaram que, embora *L. casei* tenha obtido maiores valores de UFC/mL no meio com glicose, as cepas de *L. plantarum* e *L. casei* apresentaram crescimento acima de 9,0 log de UFC/mL no meio com a inulina de alcachofra, sendo maior do que no meio com inulina comercial e nos controles negativos. Os autores concluíram que as diferenças na eficiência em fermentar a inulina extraída da alcachofra de Jerusalém se devem à capacidade específica das cepas de lactobacilos em fermentar frutanos de diferentes fontes. Portanto é importante avaliar a habilidade de fermentação do substrato pelos microrganismos probióticos que se deseja utilizar.

Comparando o crescimento dos lactobacilos no meio com yacon e no controle positivo, as cepas utilizadas neste trabalho foram capazes de se multiplicar em ambos os meios. Além disso, por não serem digeridas na passagem pelo trato gastrointestinal, as fibras do yacon estarão disponíveis no cólon, onde as bactérias colonizadoras poderão utilizá-las como fonte de carbono. Estes resultados podem ser utilizados como base para caracterizar a farinha de yacon produzida como potencial fonte de prebióticos, por estimular seletivamente o crescimento de probióticos, entretanto estudos *in vitro* e *in vivo* com as fibras do yacon isoladas são necessários para comprovação.

Nos resultados obtidos por Sousa et al. (2015), a farinha de yacon foi mais eficaz em estimular o crescimento dos lactobacilos estudados do que o FOS purificado, quando adicionado como única fonte de carbono ao meio de cultura MRS. Os autores ainda demonstraram que, apesar dos probióticos serem capazes de fermentar a glicose mais rapidamente por ser um fonte simples de carbono, a fermentação do yacon é mais eficiente, pois a farinha de yacon a 1% (m/ v) foi capaz de gerar um crescimento semelhante ao promovido pela fonte de carbono tradicional (glicose) a 2% (m / v), o que demonstra que mesmo em menores concentrações o yacon, que é rico em carboidratos, pode estimular a proliferação de probióticos.

Para o desenvolvimento da bebida de leite fermentado com yacon *L. casei* e *L. plantarum* foram selecionadas, pois apresentaram bom crescimento no meio com yacon e são comumente utilizadas para a fermentação de derivados lácteos e produtos de origem vegetal.

5.2 DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO COM FARINHA DE YACON

5.2.1 Curva de Crescimento

O valor de pH e o crescimento bacteriano de *L. casei* e *L. plantarum* das 8 formulações (Tabela 2) foram monitorados por 24 h, em intervalos de 4 h, para determinar o tempo ideal de fermentação das bebidas, os resultados estão apresentados na Figura 3.

Os FOS e carboidratos presentes no yacon podem ter contribuído com o aumento mais expressivo na contagem de células bacterianas nas formulações

contendo a farinha de yacon, pois cresceram mais de 2,0 log de UFC/mL nas formulações com yacon e menos de 1,0 log de UFC/mL no controle (Figuras 3A e 3C). Hang et al. (2020) demonstraram em seu trabalho que as cepas de *L. plantarum* se proliferaram melhor nos meios com vegetais do que no controle constituído apenas de leite, este estímulo no crescimento das células bacterianas foi atribuído à composição dos extratos vegetais utilizados. Os resultados exibidos por Yang et al. (2014), também apresentaram maior proliferação de *L. casei* e *L. plantarum* em leite desnatado com suco de amora do que no controle, devido aos açúcares presentes no suco.

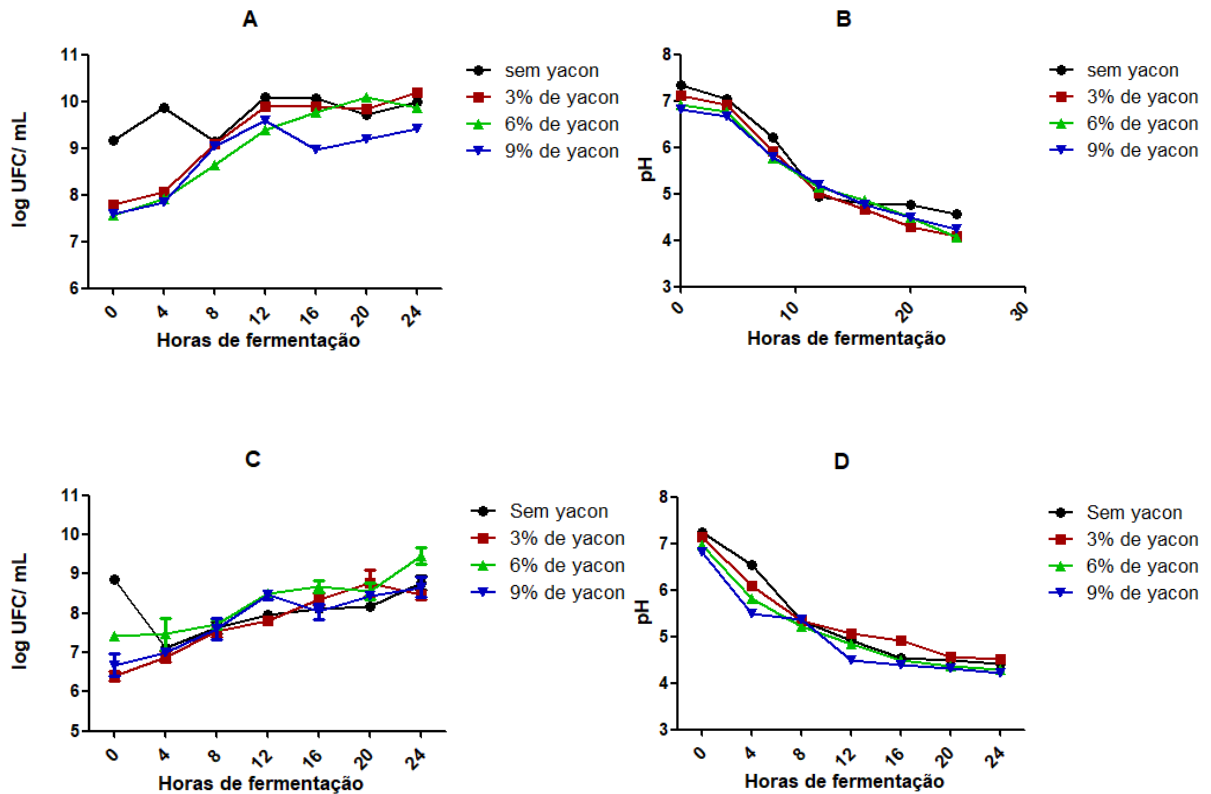
Embora os mecanismos de fermentação dos FOS pelos lactobacilos ainda não tenham sido completamente elucidados, um dos mecanismos que permite a fermentação seletiva de prebióticos por microrganismos probióticos é a presença de enzimas, como as glicosidases, no sistema enzimático de alguns microrganismos. Estas enzimas, a partir das extremidades não redutoras, degradam oligossacarídeos a monossacarídeos, sendo estes absorvidos e metabolizados pelo probiótico. A presença destas enzimas presentes nas cepas probióticas pode explicar a habilidade dos microrganismos probióticos em fermentar prebióticos e confere uma vantagem seletiva à estas bactérias (SARBINI; RASTALL, 2011).

As bebidas apresentaram decréscimo similar nos valores de pH determinados durante as 24 h de fermentação, embora nas bebidas com maiores concentrações de farinha de yacon os valores de pH determinados tenham apresentado decréscimos ligeiramente maiores do que nas bebidas controle (Figura 3B e 3D). Uma maior acidificação no meio com fontes vegetais foi verificada nos estudos de Hang et al. (2020), no qual constataram que o extrato de malte e o extrato de aveia induziram a acidificação mais acentuada em leite desnatado fermentado por *L. plantarum*, quando comparados ao grupo controle, constituído apenas de leite e relacionaram essa maior acidificação à maior proliferação celular e a composição dos extratos.

Nas Figuras 3B e 3D é possível observar a redução nos valores de pH em decorrência do tempo de fermentação, demonstrando uma forte correlação negativa entre o tempo de fermentação e o pH para todas as formulações de *L. casei* (Valor r de Pearson variando entre 0,94 e 0,98) e de *L. plantarum* (Valor r de Pearson entre 0,91 e 0,93). As formulações com *L. plantarum* com maiores concentrações de farinha de yacon tiveram um decréscimo mais rápido no valor de pH, que indica alta atividade metabólica, com pH abaixo de 5,0 e contagens acima de 8 log de UFC/mL após 16 h

de fermentação a 37 °C. Por outro lado, as formulações com *L. casei* em leite com yacon, atingiram pH próximo a 4,5 e contagens acima de 9,0 log UFC/ mL após 20 h de fermentação a 37 °C.

Figura 3 - Curvas de crescimento e pH de *L. casei* e *L. plantarum* em leite com adição de 0%, 3%, 6% e 9% de farinha de yacon por 24 horas de fermentação.



Curva de crescimento (A) e pH (B) das formulações fermentadas por *L. casei* e curva de crescimento (C) e pH (D) das formulações fermentadas por *L. plantarum*.

Considerando os valores de pH e de crescimento bacteriano, foi definido que as bebidas de *L. casei* deveriam ser fermentadas por 20 h e as de *L. plantarum* por 16 h a 37 °C, em todas as concentrações de yacon. Os valores de pH das formulações, após 20 h de fermentação, variaram de 4,28 a 4,77 para as bebidas com *L. casei* e, após 16 h de fermentação, variaram de 4,38 a 4,91 para as bebidas com *L. plantarum*. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Vasconcelos (2010) em iogurtes com diferentes concentrações de farinha de yacon, nos quais os valores de pH variaram de 4,28 a 4,69.

5.2.2 Composição Centesimal das Formulações de Bebida Fermentada

Os resultados da análise centesimal das formulações de leite fermentado por *L. plantarum* com adição de farinha de yacon encontram-se na Tabela 5, os resultados da análise centesimal dos leites fermentados por *L. casei* não estão expostos pois não diferiram significativamente dos leites fermentados por *L. plantarum*. Com o aumento da concentração de farinha de yacon, é possível verificar o aumento gradativo no teor de cinzas e carboidratos nas formulações, levando a uma proporcional diminuição de umidade.

As concentrações de lipídeos e proteínas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações (Tabela 5), o que significa que a adição da farinha de yacon não levou a um aumento expressivo destes compostos. Este resultado era previsto, pois o yacon é composto majoritariamente por fibras, carboidratos e água (Tabela 1). O resultado concorda com Vasconcelos (2010), que também não encontrou diferenças no teor de lipídeos e proteínas entre suas formulações de iogurte com diferentes concentrações de yacon. As formulações analisadas estão de acordo com a Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007) segundo a qual, leites fermentados devem apresentar no mínimo 2,9% de proteínas e para serem considerados desnatados, no máximo 0,5% de lipídeos.

Tabela 5 - Composição centesimal das formulações de leite fermentado por *L. plantarum* contendo diferentes concentrações de farinha de yacon.

Formulação	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Umidade (%)	Sólidos (%)	Carboidratos (%)
0% de yacon	3,358± 0,12 ^A	0,840± 0,07 ^C	0,022± 0,002 ^A	91,900± 0,03 ^A	8,100± 0,03 ^D	3,880± 0,11 ^D
3% de yacon	3,436± 0,13 ^A	0,941± 0,02 ^{BC}	0,009± 0,005 ^A	88,900± 0,17 ^B	11,100± 0,17 ^C	6,713± 0,22 ^C
6% de yacon	3,610± 0,16 ^A	1,026± 0,02 ^{AB}	0,021± 0,015 ^A	86,636± 0,30 ^C	13,364± 0,30 ^B	8,708± 0,38 ^B
9% de yacon	3,682± 0,20 ^A	1,105± 0,04 ^A	0,008± 0,002 ^A	84,042± 0,22 ^D	15,958± 0,22 ^A	11,163± 0,27 ^A

^A Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.2.3 Análise de Cor Instrumental

Os valores de L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul) da CIELAB obtidos para a farinha de yacon e para as formulações de bebida com e sem yacon, fermentadas por *L. casei* e *L. plantarum* encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Cor instrumental da farinha de yacon e das formulações de leite fermentado por *L. casei* e *L. plantarum* contendo diferentes concentrações de farinha de yacon.

Formulação		L*	a*	b*
<i>L. casei</i>	0% de yacon	75,56±3,26 ^a	-2,21±0,30 ^b	4,25±0,36 ^d
<i>L. casei</i>	3% de yacon	63,24±1,50 ^b	0,85±0,18 ^a	10,09±0,47 ^a
<i>L. casei</i>	6% de yacon	61,09±1,57 ^b ^c	0,73±0,10 ^a	9,41±0,47 ^b
<i>L. casei</i>	9% de yacon	58,30±0,16 ^c	0,63±0,014 ^a	8,59±0,04 ^c
<i>L. plantarum</i>	0% de yacon	76,31±3,19 ^A	-2,25±0,12 ^D	4,48±0,27 ^C
<i>L. plantarum</i>	3% de yacon	65,26±1,12 ^B	0,29±0,07 ^C	8,58±0,27 ^B
<i>L. plantarum</i>	6% de yacon	63,88±0,29 ^B	1,93±0,10 ^B	11,51±0,15 ^A
<i>L. plantarum</i>	9% de yacon	60,01±1,20 ^C	2,30±0,20 ^A	11,41±0,49 ^A
Farinha de yacon		57,02±2,02	1,97±0,14	10,31±0,31

^a Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

^A Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

A luminosidade L* para a farinha de yacon apresentou o valor de 57,02 ± 2,02. Este resultado foi similar ao obtido por Campos et al. (2016) nas farinhas de yacon preparadas com soluções ácidas e secas a 60 °C (62,53 ± 3,10) e inferior ao valor de L* para o yacon seco a 65 °C (78,6 ± 3,9). Os autores avaliaram a influência da temperatura de secagem das fatias de yacon na cor da farinha produzida e sugeriram que em temperaturas mais altas, o teor de umidade decresce rapidamente, minimizando o escurecimento enzimático e não enzimático. O valor de a* próximo a zero e de b* próximo a 10, mostram que a coloração da farinha tende mais ao amarelo, resultando em uma coloração de caramelo claro, como mostra a Figura 4.

As formulações sem yacon apresentaram alta luminosidade devido ao branco característico do leite e diferiram significativamente das formulações contendo yacon (Tabela 6). As formulações com farinha yacon apresentaram gradativa diminuição na

luminosidade com o aumento da concentração de farinha de yacon e este resultado se deve a coloração caramelo da farinha e concorda com os resultados de Vasconcelos et al. (2012), que demonstrou que em seus iogurtes conforme a quantidade de yacon aumenta, a luminosidade da bebida diminui.

Figura 4 – Fotos das bebidas de leite fermentados por *L. casei* e *L. plantarum* e da farinha de yacon*.



Fonte: O próprio autor. * *L. casei*: (A) sem yacon, (B) 3%, (C) 6% e (D) 9% de farinha de yacon. *L. plantarum*: (E) sem yacon, (F) 3%, (G) 6% e (H) 9% de farinha de yacon. (I) Farinha de yacon.

O componente cromático a* foi muito próximo a zero em todas as formulações das bebidas, assim como na farinha de yacon, indicando pouca influência de tonalidades verde a vermelho na coloração das bebidas. Já o componente cromático b*, assim como na farinha de yacon, foi muito próximo à 10, indicando que a tonalidade

mais amarelada da bebida se deve à adição da farinha de yacon. Apesar de apresentar diferenças significativas nos parâmetros a^* e b^* entre as formulações com diferentes probióticos, essa diferença é muito sutil na percepção visual de coloração das bebidas, como mostrado na Figura 4. O que se observa é uma coloração caramelo tendendo ao marrom com o aumento da concentração de farinha de yacon.

5.2.4 Avaliação da Estabilidade no Armazenamento

Durante o armazenamento o *L. casei* apresentou contagens variando entre 9 e 11 log de UFC/mL em todas as bebidas analisadas. A contagem de *L. plantarum* em log de UFC/mL na bebida sem yacon variou entre 7 e 8, enquanto nas bebidas com yacon ficou entre 8 e 9 log de UFC/mL (Figuras 5A e 5C).

Todas as bebidas fermentadas por *L. casei*, incluindo o controle, apresentaram contagens de células viáveis acima de 9,0 log de UFC/mL, durante todo o período de armazenamento refrigerado (Figura 5A), com este resultado podemos inferir que no momento do consumo da bebida serão ingeridas altas quantidades de microrganismos probióticos.

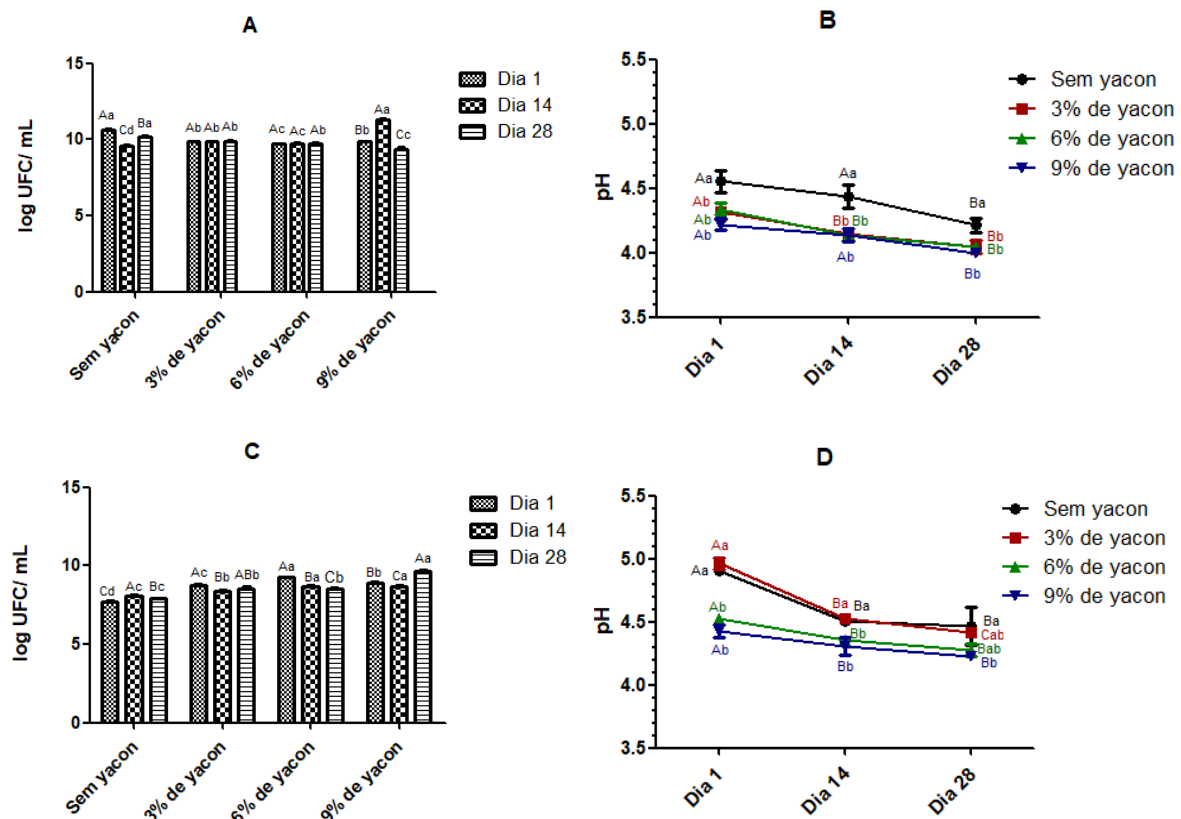
Ao final do armazenamento, as formulações de *L. plantarum* com a farinha de yacon obtiveram contagens de células bacterianas significativamente ($p < 0,05$) mais altas do que a formulação controle sem yacon e a formulação com 9% de yacon apresentou o maior valor de log de UFC/mL com 28 dias de armazenamento (Figura 5C). Esses resultados sugerem que o yacon possa ter um efeito protetor na viabilidade do *L. plantarum* durante o armazenamento refrigerado.

Os valores de pH mensurados durante o armazenamento das bebidas encontram-se nas Figuras 5B e 5D. As formulações adicionadas de farinha de yacon apresentaram valores de pH significativamente ($p < 0,05$) menores do que os controles para todas as bebidas por *L. casei*, em todos os dias de armazenamento.

As bebidas fermentadas por *L. plantarum* com 6% e 9% de farinha de yacon também apresentaram valores de pH menores do que a formulação controle e a bebida com 3% de yacon. Esses resultados sugerem que a atividade metabólica de produção de ácidos a partir da fermentação de carboidratos é mais intensa nas formulações com yacon e pode ter ocorrido devido a utilização mais eficaz da farinha de yacon, como fonte de carbono, do que apenas a lactose presente nas bebidas

controle, como foi observado por Sousa et al. (2015) que comparou o crescimento de lactobacilos em meio com glicose e em meio com farinha de yacon.

Figura 5 - Contagem de células viáveis e pH no armazenamento refrigerado por 28 dias das bebidas de leite fermentado com diferentes concentrações de yacon



* Resultados expressos em log UFC/mL. Contagem de células viáveis (A) e pH (B) nas bebidas fermentadas por *L. casei* e contagem de células viváveis (C) e pH (D) nas bebidas fermentadas por *L. plantarum* ao longo do armazenamento refrigerado (4°C). ^A Valores seguidos pela mesma letra maiúscula indicam que ao longo do armazenamento a formulação não diferiu significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^a Valores seguidos pela mesma letra minúscula indicam que as formulações com diferentes concentrações de yacon não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), no dia avaliado.

No último dia de armazenamento todos os tratamentos tiveram quedas sutis no valor do pH em relação ao primeiro dia (Figuras 5B e 5D). Decréscimos no pH também foram notados por Batista et al. (2019) em algumas de suas formulações de leite fermentado com farinha de banana e segundo o autor, isso ocorreu porque os microrganismos probióticos lentamente fermentaram parte das substâncias presentes

nas formulações, mesmo durante o armazenamento refrigerado, produzindo ácidos orgânicos que levam a redução do valor do pH.

Com os resultados apresentados é possível verificar que mesmo ao final de 28 dias de armazenamento, tanto o *L. casei*, quanto o *L. plantarum* permanecem viáveis em leite fermentado contendo yacon.

5.3 SIMULAÇÃO *IN VITRO* DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL

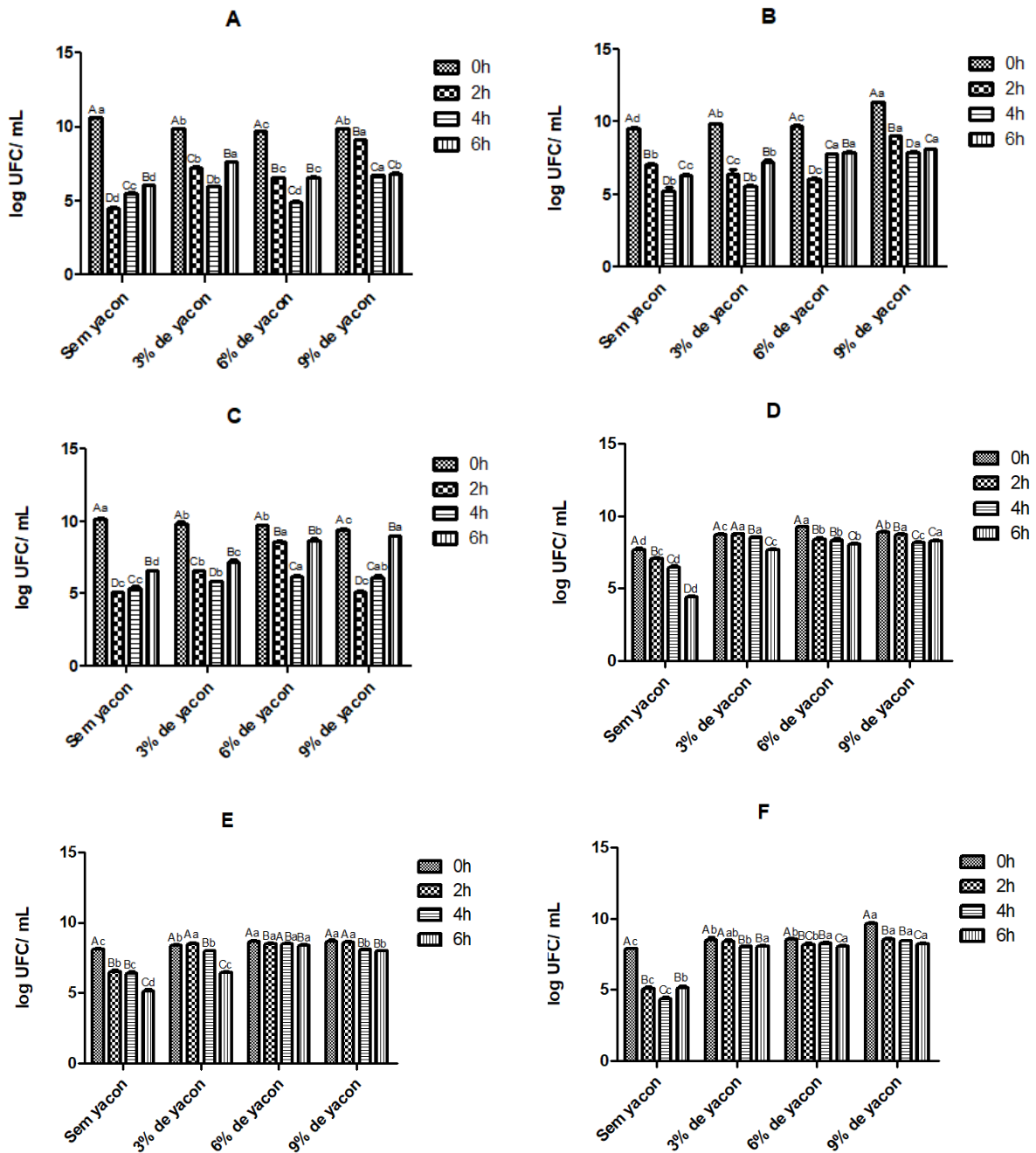
Os resultados obtidos na simulação *in vitro* da passagem dos leites fermentados pelo trato gastrointestinal estão apresentados na Figura 6 e Tabela 7. A digestão gastrointestinal foi avaliada em quatro etapas que estão apresentadas na Figura 6: a contagem de células viáveis antes da digestão (0h), durante a passagem pelo estômago (2h), na primeira parte da fase entérica (4h) e ao final da digestão (6h).

Ao analisar a contagem de células viáveis no primeiro dia de armazenamento é possível notar que as bebidas com yacon fermentadas por *L. plantarum* (Figura 6D) sofreram menores quedas na contagem durante as etapas da simulação do trato gastrointestinal do que sua respectiva formulação controle. Enquanto as formulações de *L. casei* tiveram declínios nas fases gástrica e entérica I, nas formulações com yacon e na bebida controle, na qual o declínio na contagem de células viáveis foi maior (Figura 6A).

O efeito protetor do yacon indicado pela maior contagem de células viáveis nas bebidas com farinha de yacon, comparado as bebidas controle (Figura 6) pode ser explicado pelo fato dos prebióticos não serem hidrolisados pelo trato gastrointestinal podendo agir como uma barreira física, protegendo os microrganismos das enzimas digestivas (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010).

No último dia de armazenamento, a contagem de células viáveis após a simulação gástrica foi de 6,61 e 8,97 log de UFC/mL para as formulações de leite fermentado por *L. casei* sem yacon e com 9% de farinha de yacon, respectivamente (Figura 6C) e de 5,15 e 8,21 para as bebidas de leite fermentado por *L. plantarum* sem e com 9% de farinha de yacon, respectivamente (Figura 6F). Por atingirem o tecido alvo em maiores quantidades, as colônias probióticas carregadas pelas formulações com yacon tem maior probabilidade de colonizar o intestino do que as bactérias presentes nas formulações sem yacon.

Figura 6 – Contagem de células viáveis de *L. casei* e *L. plantarum* nas bebidas durante a simulação do trato gastrointestinal



* Resultados expressos em log UFC/mL. Contagem das células viáveis de *L. casei* nos dias 1 (A), 14 (B) e 28 (C) de armazenamento e de *L. plantarum* nos dias 1 (D), 14 (E) e 28 (F), respectivamente. Antes (0h) e após exposição a condições gástricas (2h) e entéricas (4h e 6h). ^A Valores seguidos pela mesma letra maiúscula indicam que as contagens de UFC/mL não diferiram na formulação durante as etapas da simulação gástrica de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), no dia avaliado e ^a valores seguidos pela mesma letra minúscula indicam que as formulações não diferiram entre si no dia e na etapa da simulação gástrica avaliada de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na tabela 7 é possível observar que ao final das 6 h do experimento a contagem de células viáveis de *L. casei* e *L. plantarum* sempre se manteve maior nas formulações com yacon do que nas formulações controle, em todos os dias avaliados.

Tabela 7 – Porcentagem de sobrevivência do *L. casei* e do *L. plantarum* após simulação de digestão gastrointestinal dos leites fermentados e armazenados por 1, 14 e 28 dias.

A - Porcentagem de sobrevivência do <i>L. casei</i>				
	0% de yacon	3% de yacon	6% de yacon	9% de yacon
Dia 1	57,08± 0,33 ^{Bd}	77,35± 0,20 ^{Aa}	67,89± 0,56 ^{Cc}	69,24± 0,44 ^{Cb}
Dia 14	66,20± 0,50 ^{Ad}	73,58± 1,11 ^{Bb}	81,23± 0,73 ^{Ba}	71,41± 0,62 ^{Bc}
Dia 28	64,97± 0,85 ^{Ad}	73,34± 1,07 ^{Bc}	89,31± 0,98 ^{Ab}	95,57± 0,92 ^{Aa}

B - Porcentagem de sobrevivência do <i>L. plantarum</i>				
	0% de yacon	3% de yacon	6% de yacon	9% de yacon
Dia 1	57,64±0,76 ^{Bc}	87,79±0,20 ^{Bb}	86,98±0,34 ^{Cb}	93,37±1,04 ^{Aa}
Dia 14	63,31±1,23 ^{Ad}	76,89±0,45 ^{Cc}	96,77±1,18 ^{Aa}	92,15±0,80 ^{Ab}
Dia 28	65,25±1,44 ^{Ac}	94,46±0,79 ^{Aa}	94,24±0,10 ^{Ba}	85,11±0,85 ^{Bb}

^A Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e ^a valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados do *L. casei* indicam que a presença de yacon ajudou significativamente ($p < 0,05$) na sobrevivência do microrganismo, quando comparadas ao controle. No primeiro dia de armazenamento, a formulação com 3% de farinha de yacon apresentou a maior sobrevivência após a simulação gástrica (77,3%) e foi estatisticamente ($p < 0,05$) maior do que as formulações com 0, 6% e 9% (Tabela 7A). No 28º dia de armazenamento a formulação fermentada por *L. casei* com 9% de farinha de yacon foi a que apresentou a maior sobrevivência após a simulação gástrica (95,5%), com valores médios de 8,97 log de UFC/mL e foi significativamente ($p < 0,05$) superior às formulações com 0, 3% e 6%.

Em todos os dias de armazenamento, a formulação controle do *L. casei* obteve as menores porcentagens de sobrevivência, indicando que o yacon tem a capacidade de proteger a cultura de *L. casei* em condições adversas. Além disso, a porcentagem de sobrevivência aumentou durante o armazenamento das formulações com as maiores concentrações de farinha de yacon (Tabela 7A) indicando que a população de microrganismos presente nestas formulações se tornou mais resistente à condições adversas durante o armazenamento refrigerado.

Para o *L. plantarum*, a formulação sem yacon apresentou porcentagens de sobrevivência estatisticamente menores ($p < 0,05$) do que as formulações com yacon, em todos os dias analisados (Tabela 7B). No 1º dia de armazenamento a formulação com 9% de farinha de yacon obteve a maior sobrevivência (93,4%) após a simulação da digestão gastrointestinal, com média de 8,3 log de UFC/mL (Figura 6D). No 28º dia de armazenamento, as formulações com 3% e 6% de yacon apresentaram as maiores taxas de sobrevivência, e não apresentaram diferenças entre si, mas foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) das formulações com 0 e 9% de farinha de yacon (Tabela 7B). Estes resultados sugerem que para o *L. plantarum* a proteção do yacon às condições adversas não é dependente da concentração.

Para exercer os seus efeitos no tecido alvo, os probióticos precisam sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal, onde se deparam com condições desfavoráveis, como o baixo pH estomacal e a presença de enzimas digestivas e sais biliares. Os prebióticos podem auxiliar na sobrevivência das células bacterianas, como foi descrito por Zhang et al. (2019) em seu trabalho com oligossacarídeos sintetizados por algas vermelhas e Leone et al. (2017), que incorporaram *L. casei* LC-01 ao yacon seco e avaliaram sua taxa de sobrevivência após a simulação gástrica em amostras armazenadas por 28 dias, a porcentagem de células viáveis após a simulação gástrica foi de 82,81%. Estes resultados com altas taxas de sobrevivência dos probióticos na presença de prebióticos corroboram com os dados obtidos para as formulações de leite fermentado com farinha de yacon reportado neste trabalho (Tabela 7).

O efeito protetivo de prebióticos também foi registrado por Khorasani e Seyed (2017) que obtiveram taxas de sobrevivência após a simulação gástrica acima de 90% em suas matrizes simbióticas com revestimento de amido. Buriti, Castro e Saad (2010) concluíram que a adição de inulina em mousses de goiaba refrigerados foi responsável pelo aumento da sobrevivência de *L. acidophilus*, quando comparado ao seu controle, sem inulina, na primeira semana de armazenamento.

Em seus estudos com leite fermentado probiótico Pena et al. (2020) também demonstraram alta taxa de sobrevivência probiótica após a simulação gástrica (de 8,50 para 7,83 log UFC/mL ao final da digestão) e, segundo os autores parte dessa sobrevivência se deve a maior tolerância que os probióticos possuem a condições ácidas, mas que os principais fatores que favorecem a sobrevivência são a matriz alimentícia e a cepa envolvidas.

Um mecanismo pelo qual os prebióticos são capazes de proteger os probióticos em situações de estresse foi estudado por Succi et al. (2017), os autores avaliaram a síntese proteica de cepas de *L. rhamnosus* em meio com prebióticos e sugerem que a maior proteção conferida pelos prebióticos aos probióticos pode estar ligada à indução na expressão de bandas proteicas nos probióticos, pois, ao verificarem os produtos da fermentação de prebióticos e glicose por *L. rhamnosus* GG, Succi et al. (2017) detectaram a síntese de proteínas diferentes quando *L. rhamnosus* GG fermentou os prebióticos, comparado ao controle de glicose. Os resultados desses autores indicam que a adaptação à ambientes hostis pode estar associada a síntese proteica, pois as proteínas formadas apresentaram alta correlação com a sobrevivência dos probióticos após a simulação gástrica e a composição das proteínas sintetizadas é depende do prebiótico e das cepas utilizadas (SUCCI et al., 2017).

Assim, os prebióticos além de agir como barreira física protegendo os probióticos das ações enzimáticas (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010), em condição de estresse podem induzir nos probióticos a síntese de proteínas que atuam no metabolismo de carboidratos e na proteção celular (SUCCI et al., 2017). Os resultados apresentados demonstram que a incorporação de prebióticos em alimentos fermentados por probióticos auxilia na sobrevivência bacteriana após a digestão e conseqüentemente aumenta suas chances de adesão e colonização no lúmen intestinal.

5.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE PROPRIEDADES BIOATIVAS DAS BEBIDAS FERMENTADAS

5.4.1 Capacidade Antioxidante

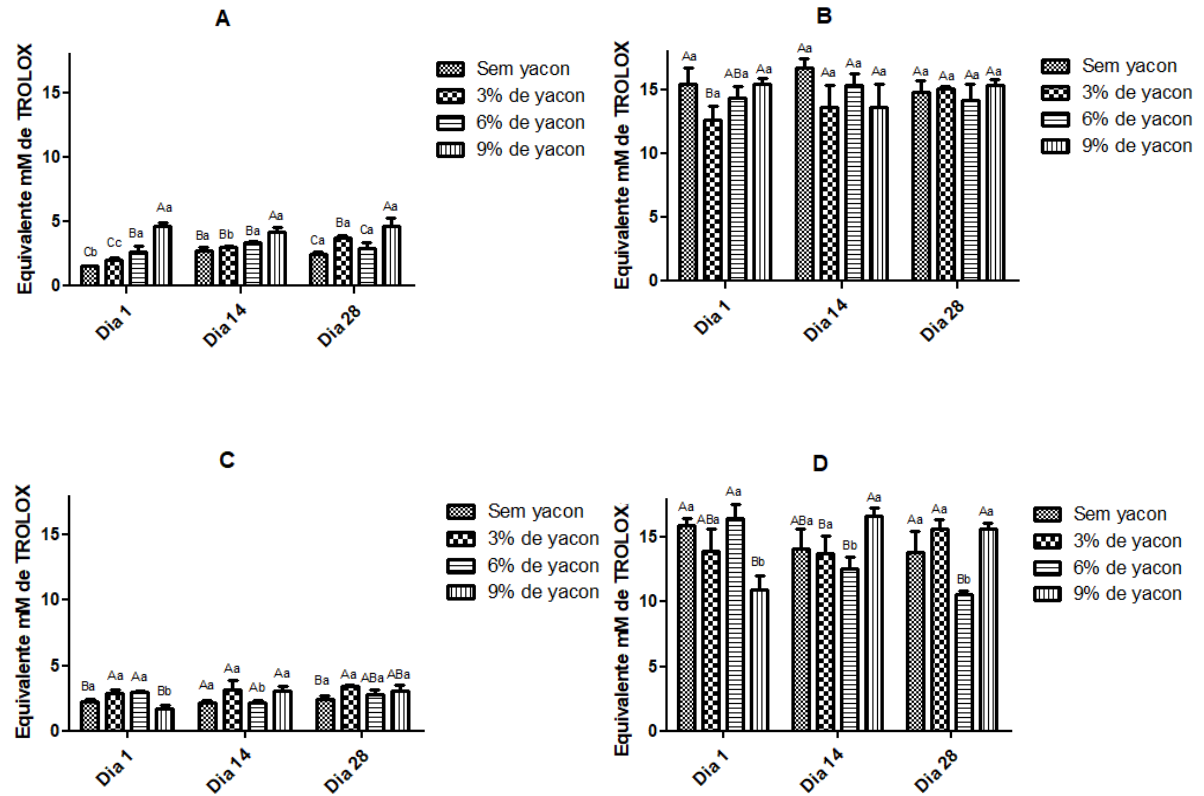
As oito formulações de leite fermentado foram analisadas quanto a sua capacidade antioxidante pelas metodologias de ABTS e FRAP nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento, antes e após a simulação da digestão gastrointestinal.

Os resultados da capacidade de inibição do radical ABTS⁺ estão apresentados na Figura 7. Os resultados obtidos para o leite fermentado por *L. casei* (Figura 7A) sem yacon estão de acordo com os descritos por Solieri, Rutella e Tagliacruzchi (2015), que também obtiveram resultados próximos a 1,2 mM de equivalentes de trolox em leite fermentado por *L. casei*. Na presença do yacon, é possível observar que quanto maior a concentração de yacon, maior a capacidade de captura do radical ABTS e que a formulação com 9% de farinha de yacon continuou a apresentar a maior atividade antioxidante ao longo de todo o armazenamento, não apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias analisados (Figura 7A). Este resultado indica que os compostos com potencial antioxidante são estáveis no armazenamento refrigerado.

Durante a fermentação, as bebidas com yacon apresentaram pH mais baixo e maior proliferação de microrganismos (Figura 3), isso indica que a presença do yacon acentuou o metabolismo dos microrganismos e, como pode ser observado na Figura 7A, propiciou a formação de mais compostos com a capacidade de sequestrar o radical ABTS⁺, estes compostos podem ser peptídeos derivados da hidrólise das proteínas do leite liberados pelas enzimas do sistema proteolítico do *L. casei*, pois como foi estudado por Solieri, Rutella e Tagliacruzchi (2015) ao ser processado, fermentado ou digerido, o leite libera diversos peptídeos, alguns deles possuem propriedades bioativas em sistemas fisiológicos específicos, como por exemplo, podem causar a eliminação de radicais e evitar o desencadeamento do estresse oxidativo.

Após a digestão das formulações de *L. casei*, a atividade antioxidante determinada por ABTS aumentou significativamente ($p < 0,05$) em todos os tratamentos e não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as formulações e dias de armazenamento (Figura 7B). Durante a digestão, as variações de pH e as enzimas digestivas levaram a hidrólise das proteínas do leite (Figura 10) e podem ter liberado peptídeos com função antioxidante e por isso, após a digestão, a presença do yacon não influenciou a atividade antioxidante (Figuras 7B e 7D).

Figura 7 – Determinação da capacidade de sequestro do radical ABTS pelas bebidas fermentadas por *L. casei* e por *L. plantarum* antes e após a simulação do trato gastrointestinal.



(A) formulações fermentadas por *L. casei* antes e (B) após a simulação do trato gastrointestinal; (C) formulações fermentadas por *L. plantarum* antes e (D) após a simulação do trato gastrointestinal. ^A Valores seguidos pela mesma letra maiúscula indicam que as formulações com diferentes concentrações de yacon não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), no dia avaliado e ^a valores seguidos pela mesma letra minúscula indicam que a formulação não diferiu ao longo do armazenamento de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados da capacidade de sequestro do radical ABTS das bebidas fermentadas por *L. plantarum*, antes e após a digestão (Figuras 7C e 7D) demonstram que as formulações com yacon não são diferentes do controle, indicando que a concentração de yacon não influencia a capacidade de captura do radical ABTS para as formulações fermentadas por *L. plantarum*. É possível que as enzimas presentes no sistema proteolítico da cepa de *L. plantarum* utilizada não hidrolisem as proteínas do leite no mesmo sítio ativo que as enzimas do *L. casei* e por isso os peptídeos gerados na fermentação não possuem a mesma ação antioxidante. Após a digestão, assim como ocorreu com as amostras fermentadas por *L. casei*, a capacidade

antioxidante determinada por ABTS aumentou significativamente, possivelmente devido a ação das enzimas digestivas que atuaram sobre as proteínas do leite.

Após a digestão, a capacidade de capturar o radical ABTS+ aumentou em todas as formulações, independentemente da presença de yacon ou do microrganismo utilizado, demonstrando que as substâncias com atividade antioxidante são provenientes do leite e que a digestão proporciona uma liberação intensa destas substâncias, que segundo dados da literatura (CHOI et al., 2012) podem ser peptídeos bioativos derivados da hidrólise das proteínas do leite.

A capacidade de sequestrar o radical livre ABTS+ aumentou cerca de cinco vezes após a simulação da digestão, para todas as bebidas (Figura 7). Isso sugere que uma vez que a bebida seja ingerida, os compostos com atividade antioxidante serão liberados diretamente no trato gastrointestinal, onde poderão atuar ou ser transportados por carreadores celulares para outros sistemas fisiológicos.

Alguns dos compostos antioxidantes que podem ser liberados durante a digestão são os peptídeos bioativos, que enquanto compõem as proteínas do leite encontram-se em sua forma inativa, mas ao serem digeridos por enzimas ou quebrados pelos sistemas proteolíticos bacterianos, estes peptídeos são liberados e se tornam biodisponíveis. Alguns dos peptídeos mais estudados, derivados da digestão do leite, possuem atividades antioxidante de sequestro de radicais livres e de inibição da peroxidação lipídica (PARK; NAM, 2015).

Após a simulação gástrica, Cilla et al. (2011) observaram o aumento de 20% na capacidade antioxidante determinada por ABTS, quando comparado a bebida não digerida. Os autores argumentaram que o aumento pode estar relacionado à liberação de aminoácidos a partir da matriz alimentar durante a digestão e que apesar do método de digestão simulada *in vitro* não ser equivalente ao *processo in vivo*, ela pode auxiliar na compreensão da estabilidade e bioacessibilidade de compostos antioxidantes. Os valores encontrados no presente trabalho apresentaram um aumento mais expressivo da capacidade antioxidante do que o observado por Cilla et al. (2011) e boa estabilidade durante o armazenamento das bebidas.

Diferentemente dos resultados obtidos pelo método de captura do radical ABTS, em que a atividade antioxidante aumentou após a digestão (Figura 7), para a maioria dos tratamentos a capacidade de redução do íon ferro se manteve ou diminuiu ligeiramente após a simulação gástrica das bebidas de leite fermentado (Figura 8). Esses resultados sugerem que as substâncias com atividade antioxidante liberadas

na digestão das bebidas fermentadas, agem como doadores de prótons e por isso capturam o radical ABTS com mais eficiência do que são capazes de reduzir o íon ferro. Exemplos de compostos antioxidantes doadores de prótons são aminoácidos como triptofano, lisina e tirosina, presentes em proteínas, das quais são liberados durante a digestão por ação enzimática (RIBEIRO; ROCHA; PRUDÊNCIO, 2021) e podem ter sido os responsáveis pelo aumento da capacidade antioxidante observada nas figuras 7B e 7D.

Analisar o potencial antioxidante após a digestão é importante para a compreensão da bioacessibilidade das substâncias. Ryan e Prescott (2010) ao verificarem a diferença na capacidade antioxidante de sucos de fruta comerciais, antes e após a simulação do trato gastrointestinal, concluíram que após a digestão, a capacidade antioxidante aumentou em alguns tipos de suco. Porém, assim como ocorreu neste trabalho, Ryan e Prescott (2010) também não encontraram diferenças significativas nos valores de FRAP dos sucos de maçã e laranja, de antes e de depois da simulação gástrica, isso ocorre devido a composição da matriz, que ao ser digerida pode não liberar compostos com a capacidade de reduzir íons férricos.

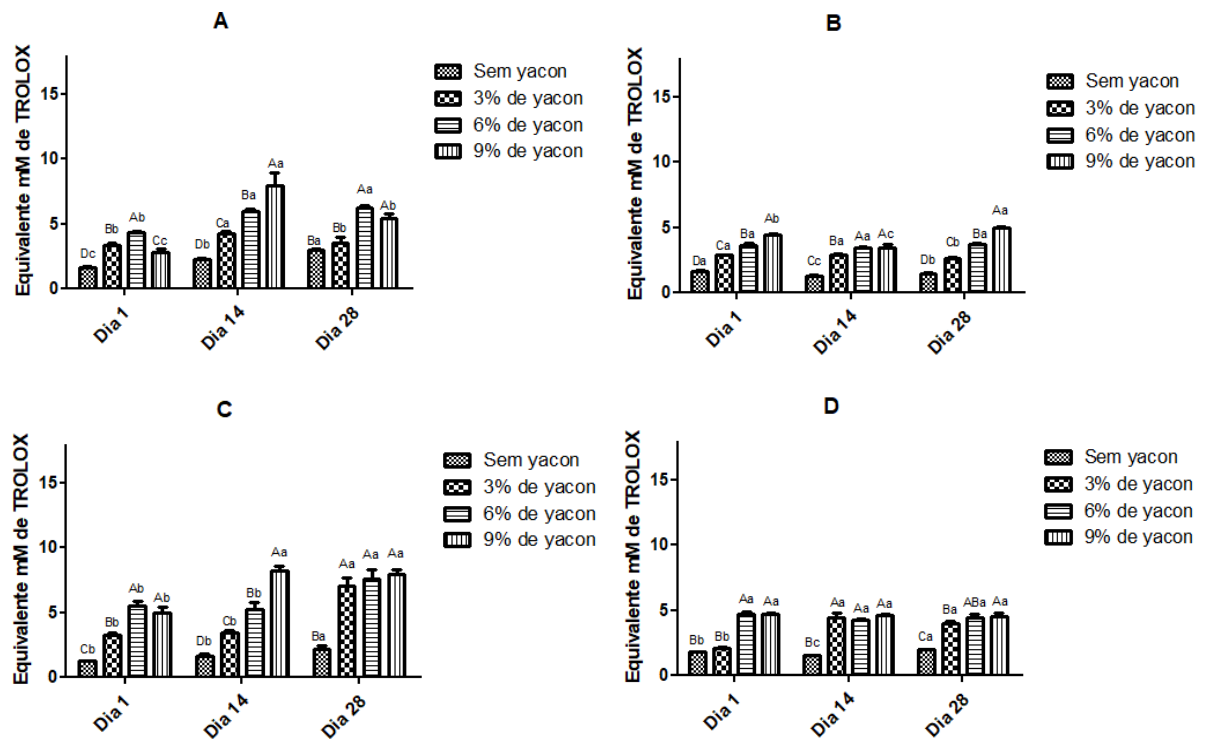
A concentração de yacon e os valores obtidos pelo método de FRAP nas bebidas fermentadas possuem forte correlação positiva, o que indica que a capacidade das bebidas em reduzir íons ferro é proporcional a concentração de yacon. Para as bebidas fermentadas por *L. casei*, a correlação de Pearson entre a concentração de yacon e atividade antioxidante foi de 0,82 e após a digestão essa correlação passa a ser de 1,00. Nas bebidas fermentadas por *L. plantarum* a correlação entre a concentração de yacon e a atividade antioxidante foi de 0,84 e após a digestão foi de 0,88. Esse efeito também pode ser verificado nas Figura 8, onde é possível notar que a capacidade de redução do íon ferro é significativamente ($p < 0,05$) maior nas formulações com maiores concentrações de farinha de yacon.

Segundo Khajehei et al. (2018) os polifenóis presentes na raiz do yacon podem ter acarretado os valores de FRAP determinados pelos autores em seus estudos com a raiz de yacon e também podem ser os responsáveis pelos valores de FRAP determinados neste trabalho, pois a atividade antioxidante determinada por FRAP foi dependente da concentração de yacon.

Durante o armazenamento as bebidas apresentaram um ligeiro aumento na capacidade de reduzir o íon ferro (Figura 8), Cilla et al. (2011) em seus estudos sobre influência do armazenamento e da digestão gastrointestinal *in vitro* na capacidade

antioxidante total de bebidas de frutas com e sem adição de leite, também notaram que a capacidade antioxidante da bebida de frutas variou durante todo o armazenamento. Este aumento foi atribuído à possível oxidação dos compostos antioxidantes presentes nas bebidas, que tornam as moléculas, que são agentes redutores, mais reativas, além da possibilidade de síntese de novos compostos com atividade antioxidante.

Figura 8 – Determinação da capacidade de redução do íon ferro pelas bebidas fermentadas por *L. casei* e por *L. plantarum* antes e após a simulação do trato gastrointestinal.



Bebidas fermentadas por *L. casei* antes (A) e após a simulação do trato gastrointestinal (B) e bebidas fermentadas por *L. plantarum* antes (C) e após a simulação do trato gastrointestinal (D).^A Valores seguidos pela mesma letra maiúscula indicam que as formulações com diferentes concentrações de yacon não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), no dia avaliado e ^a valores seguidos pela mesma letra minúscula indicam que a formulação não diferiu ao longo do armazenamento de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Defesas enzimáticas e não-enzimáticas compõem o complexo sistema de defesa antioxidante do corpo humano onde agem para neutralizar os radicais livres, responsáveis pelo desencadeamento de condições patológicas crônicas, como

doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. A ingestão de alimentos ricos em substâncias antioxidantes pode ajudar na manutenção do equilíbrio necessário ao sistema de defesa e conseqüentemente contribuir para a prevenção de doenças crônicas (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

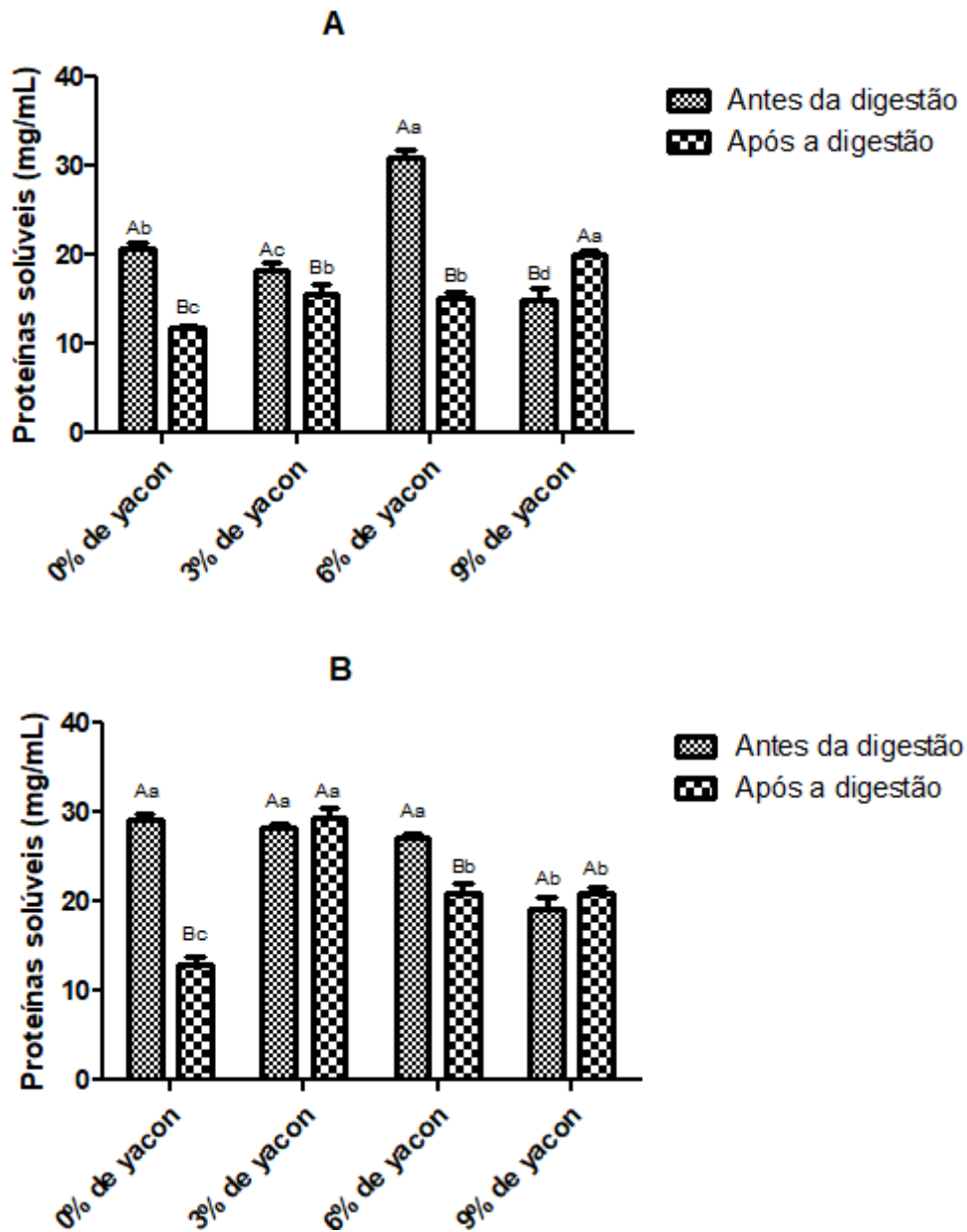
Em seus estudos, Henning et al. (2014) observaram que, após a simulação gástrica, a atividade antioxidante dos suplementos alimentares estudados foi alterada, pois para as amostras de chá verde e semente de uva a atividade diminuiu, enquanto para o açaí e romã atividade antioxidante aumentou. Após verificar estes resultados concluíram que a digestão pode alterar as propriedades antioxidantes, devido a variada composição química dos compostos antioxidantes e forma de processamento das amostras. Esses estudos ajudam a entender porque as respostas encontradas pelos diferentes métodos de avaliar a capacidade antioxidante apresentaram resultados variados, pois cada método avalia um mecanismo antioxidante diferente e analisar as bebidas com métodos diferentes proporcionou um maior entendimento da influência da presença do yacon nos compostos produzidos antes e após a digestão.

5.4.2 Avaliação da Hidrólise das Proteínas Presentes nas Bebidas

Os resultados da determinação de proteínas solúveis nas amostras de bebida fermentada por *L. casei* e *L. plantarum* antes e após a simulação da digestão gastrointestinal podem ser observados na Figura 9.

Embora para as bebidas fermentadas por *L. plantarum* com 3% e 9% de farinha de yacon não haja diferença significativa entre a concentração de proteínas solúveis antes e após a digestão, de modo geral podemos observar que a quantidade de proteínas solúveis diminuiu após a simulação gástrica das bebidas fermentadas (Figura 9), isso pode ter ocorrido porque segundo Kruger (2009) e Nwachukwu e Aluko (2019), o corante comassie Blue não se liga a peptídeos menores do que 3 kDa e por isso o método de Bradford pode não ser apropriado para quantificar estes peptídeos que podem ter sido liberados durante a proteólise e levaram a diminuição na quantidade de proteínas detectadas pelo método.

Figura 9– Determinação das proteínas solúveis presentes nas bebidas de leite fermentadas por *L. casei* e *L. plantarum*, antes e após a simulação da digestão.



* Valor expresso em mg de proteínas solúvel/mL

Bebidas de leite fermentadas por *L. casei* (A) e *L. plantarum* (B). ^A Valores seguidos pela mesma letra maiúscula para cada formulação indicam que o teor de proteínas solúveis não difere entre antes e após a simulação da digestão no trato gastrointestinal de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^a Valores seguidos pela mesma letra minúscula indicam que o teor de proteínas solúveis entre as formulações para cada microrganismo antes ou após a simulação da digestão não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Matar et al. (1996) demonstraram que o sistema proteolítico das LAB e a produção de ácido podem influenciar o perfil de liberação de peptídeos na digestão, facilitando a hidrólise das proteínas. Segundo os autores, o processo de fermentação

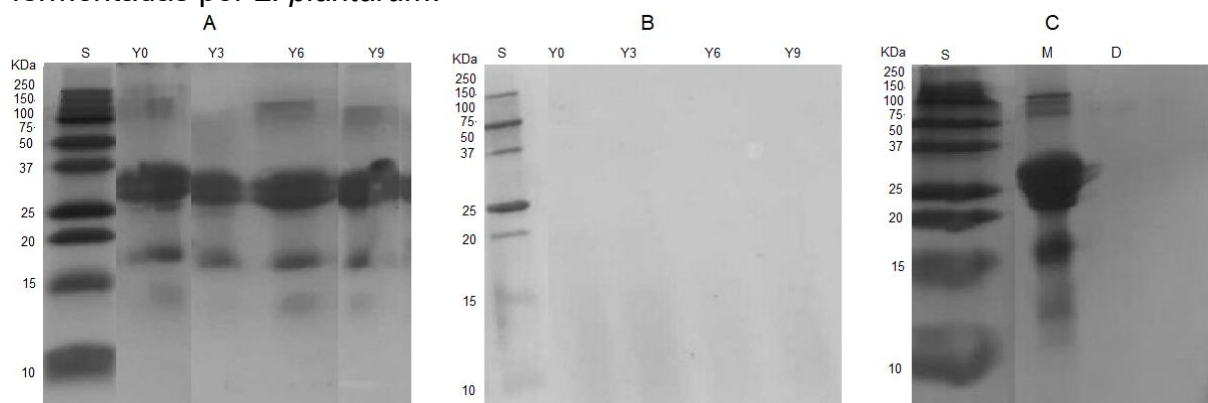
do leite pode fornecer um mecanismo que leva à liberação de novos peptídeos, a partir proteínas do leite durante a digestão.

As proteínas do leite são uma das fontes de peptídeos com atividade fisiológica mais estudadas, estes peptídeos bioativos provenientes de alimentos podem exercer sua ação em diferentes sistemas fisiológicos se forem liberados com eficiência da matriz alimentícia onde se encontram agrupados em proteínas maiores, essa liberação pode ocorrer durante a proteólise catalisada pela digestão (LEDESMA et al, 2004). A sequência de aminoácidos que compõe o peptídeo determina o mecanismo de ação, por exemplo, para peptídeos do leite com ação antioxidante a captura de radicais livres e a habilidade de quelar metais encontradas dependem dos grupos químicos dos aminoácidos e a posição deles na estrutura do peptídeo (TONOLO et al., 2018).

A liberação de peptídeos a partir da proteólise do leite fermentado pode estar relacionada com o aumento da atividade antioxidante observada após a digestão pela determinação da capacidade de sequestro do radical ABTS (Figura 7).

Para caracterizar a proteólise após a simulação gástrica foram avaliados os perfis eletroforéticos das proteínas do leite e das bebidas fermentadas por *L. plantarum* antes e após digestão (Figura 10). O perfil eletroforético para as bebidas fermentadas por *L. casei* foram semelhantes às fermentadas por *L. plantarum* (dados não mostrados).

Figura 10 – Perfil eletroforético SDS-PAGE das proteínas presentes nas bebidas fermentadas por *L. plantarum*.



(A) antes e (B) após a simulação da digestão no trato gastrointestinal; (C) proteínas do leite. Padrão (S), bebida sem farinha de yacon (Y0) e bebidas com 3% (Y3), 6% (Y6) e 9% (Y9) de farinha de yacon; leite antes (M) e após (D) a simulação da digestão no trato gastrointestinal.

As proteínas formam complexos com carga negativa ao reagirem com o detergente aniônico, sódio laurel sulfato (SDS). O complexo formado é proporcional ao tamanho da proteína e são separados e distribuídos por tamanho molecular ao longo do gel. Na eletroforese das bebidas fermentadas (Figura 10A) é possível observar as principais proteínas que compõem o leite, entre elas a β -caseína e α -caseína, localizadas entre as bandas de 25 e 37 KDa, e as α -lactoglobulinas e β -lactoglobulinas nas bandas entre 15 e 20 KDa. Estas proteínas também foram identificadas por Shi et al. (2014), que estudaram a influência da fermentação na caseína e lactoglobulinas presentes no leite de vaca. Segundo os autores, as caseínas são mais resistentes à fermentação do que as lactoglobulinas, e isso pode ser observado na Figura 10A na qual as bandas referentes às lactoglobulinas aparecem menos intensas do que na Figura 10C de leite desnatado, indicando que as proteínas podem ter sido hidrolisadas durante a fermentação dando origem a fragmentos proteicos menores.

Após a simulação da digestão gastrointestinal das bebidas não foi possível identificar nenhuma banda proteica (Figura 10B). Isso se deve à ação das enzimas proteolíticas durante a digestão, que também atuaram intensamente sobre o leite (Figura 10C).

Resultados similares foram descritos por outros autores. Wada et al. (2014) também não observaram bandas das proteínas do leite após a simulação da digestão no trato gastrointestinal devido à ação das enzimas proteolíticas e variações de pH. Gass et al. (2007) avaliaram o efeito dos ácidos biliares na hidrólise de proteínas por enzimas gástricas e observaram que a intensidade das bandas de proteínas diminuíram de acordo com o tempo de incubação. Além disso, observaram que a combinação de enzimas com os ácidos biliares, aumentaram drasticamente a proteólise das proteínas por proteases pancreáticas. Segundo os autores, os ácidos biliares aceleram a digestão das proteínas ao desestabilizar as estruturas terciárias, tornando-as mais susceptíveis a ação enzimática.

Neste trabalho, os ácidos biliares e as enzimas pancreáticas foram utilizados para simulação da digestão no trato gastrointestinal e assim como descrito por Gass et al. (2007) essa combinação pode ter causado hidrólise intensa das proteínas presentes nas formulações de leite fermentado, como pode ser observado na Figura 10B na qual as bandas proteicas praticamente desapareceram, comparadas às proteínas antes da digestão (Figura 10A). Estes resultados, aliados ao observado para

o teor de proteínas solúveis, podem indicar que a proteólise favoreceu a formação de peptídeos com massa molecular menor do que 3 kDa.

Outros trabalhos evidenciaram a formação de peptídeos de baixa massa molecular após a digestão de leite e leite fermentado utilizando técnicas de LC-MS/MS (WADA et. al., 2014) e HPLC/MS (LEDESMA et. al., 2004). Foram identificadas sequências peptídicas previamente descritas como inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ECA), que tem ação anti-hipertensiva, e peptídeos com capacidade antioxidante e citomodulatória. Estas metodologias podem ser aplicadas em trabalhos futuros para identificar os peptídeos liberados das bebidas fermentadas com yacon.

Neste trabalho, verificou-se intensa proteólise após a simulação da digestão gástrica (Figura 10), associada ao aumento da atividade antioxidante determinada pelo método de captura do cátion ABTS (Figura 7). A hidrólise das proteínas pode ter gerado peptídeos de baixa massa molecular com a capacidade de reduzir radicais livres. Como os resultados mostram que o aumento da atividade antioxidante ocorre após a passagem pelo trato gastrointestinal, os compostos antioxidantes deverão ser liberados diretamente no intestino, onde poderão agir ou ser absorvidos para atuar sistemicamente.

6 CONCLUSÃO

A farinha de yacon foi eficientemente utilizada como fonte de energia pelas cepas de *L. casei* e *L. plantarum* e a adição de yacon às formulações de bebidas fermentadas promoveu maior viabilidade celular durante o armazenamento das bebidas fermentadas por *L. plantarum*. Já para as bebidas fermentadas pelo *L. casei* todas apresentaram estabilidade e alta contagem celular durante os 28 dias de armazenamento refrigerado. A adição de yacon às bebidas provocou expressivo aumento na porcentagem de sobrevivência dos microrganismos estudados após a simulação da digestão pelo trato gastrointestinal. A farinha de yacon pode ser utilizada como substrato para *L. casei* e *L. plantarum* e auxilia na sobrevivência bacteriana, aumentando as chances de adesão e colonização no trato gastrointestinal do consumidor. Estudos *in vivo* ainda devem ser realizados para a comprovação.

A concentração de yacon influencia positivamente a capacidade das bebidas em reduzir do íon ferro. A capacidade de sequestro de radicais livres das bebidas aumenta expressivamente após a digestão, sugerindo que as moléculas com atividade antioxidante serão liberadas diretamente no intestino do consumidor, onde poderão atuar ou ser absorvidas e distribuídas para agir sistemicamente. O aumento da capacidade de capturar radicais livres está associado à hidrólise das proteínas do leite fermentado, possivelmente devido à geração de peptídeos bioativos com atividade antioxidante. Novos estudos são necessários para isolar e identificar estes peptídeos e para avaliar o potencial prebiótico das fibras de yacon isoladamente.

REFERÊNCIAS

AACC. **Approved Methods of Analysis**. Cereals & Grains Association, St. Paul, MN, U.S.A. 2000

ALAM, N; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.21, p.143–152, 2013.

AOAC. HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 21^a ed., 2019.

BATISTA, A. L. D., et al. "Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour." **Journal of functional foods**, v.38, p.242-250, 2017.

BEDANI, R. I., et al. "Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage." **LWT-Food Science and Technology**, v.55.2, p.436-443, 2014.

BENZIE, I. F. F; STRAIN, J. J. "Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration". **Methods in Enzymology**, v. 299, p.15-27, 1999.

BINDA, S., et al. "Criteria to qualify microorganisms as "probiotic" in foods and dietary supplements." **Frontiers in Microbiology**, v.11, p 1-9, 2020.

BINNS, N. **Probióticos, Prebióticos e a Microbiota Intestinal**. Monografias Concisas. ILSI Europe. 2013.

BRADFORD, M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". **Analytical biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976

BRASIL, R. B., et al. "Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino". **Ciência Animal**, v.25.2, p.71-80, 2015.

BRASIL. ANVISA. RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Ministério da Saúde**. 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **MAPA**. 23 de outubro de 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Ministério da saúde**. 12 de novembro de 2012.

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

CAETANO, B.F.R., et al. "Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides". **Nutrients**, v.8, p.1-13, 2016.

CAMPOS, D; AGUILAR-GALVEZ A; PEDRESCHI, R. "Stability of fructooligosaccharides, sugars and colour of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots during blanching and drying". **International Journal of Food Science & Technology**, v.51.5, p.1177-1185, 2016.

CHOI, J., et al. "Bioactive peptides in dairy products". **International Journal of Dairy Technology**, v.65.1, p.1-12, 2012.

CILLA, A., et al. "Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages". **Journal of food composition and analysis**, v.24.1, p.87-94, 2011.

DELGADO, G. T. C. "Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food". **Plant Foods Hum Nutr.**, v.68, p.222–228, 2013.

FIGUEROA-GONZALEZ, I., et al. "Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products". **Food Science and Technology**, v.39.3, p.747-753, 2019.

GASS, J., et al. "Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids." **Gastroenterology**, v.133.1, p.16-23, 2007.

HANG, F., et al. "Preliminary study for the stimulation effect of plant-based meals on pure culture *Lactobacillus plantarum* growth and acidification in milk fermentation". **Journal of Dairy Science**, v.103, p.4078-4087, 2020.

HENNING, S. M., et al. "Variability in the antioxidant activity of dietary supplements from pomegranate, milk thistle, green tea, grape seed, goji, and acai: effects of *in vitro* digestion". **Journal of agricultural and food chemistry**, v.62.19, p.4313-4321, 2014.

HILL, D., et al. "The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications". **Frontiers in microbiology**, v.9, 2018

HUEBNER, J., et al. "Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics." **International Dairy Journal** v.18.3 p. 287-293, 2008.

IRAPORDA, C., et al. "Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells." **Immunobiology**, v.220.10, p.1161-1169, 2015.

IRAPORDA, C., et al. "Influence of inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains". **LWT**, v.101, p.738-746, 2019.

KHAJEHEI, F., et al. "Yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) as a novel source of health promoting compounds: antioxidant activity, phytochemicals and sugar content in flesh, peel, and whole tubers of seven cultivars." **Molecules**, v. 23.2 p. 278- 297, 2018.

KERRY, R. G., et al. "Benefaction of probiotics for human health: A review". **Journal of food and drug analysis**, v.30, p.1-13, 2018.

KHORASANI, A. C; SEYED A. S. "Starch-and carboxymethylcellulose-coated bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposite as novel protective prebiotic matrices". **Food Hydrocolloids**, v.63, p.273-285, 2017.

KRUGER, N. J. "The Bradford method for protein quantitation". **The protein protocols handbook**. p.17-24, 2009.

LAEMMLI, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". **Nature**, v.227, n.15, p. 685-689, 1970.

LEDESMA, B. H., et al. "Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion". **Journal of Chromatography**, v.1049, p.107-114, 2004.

LEONE, R. S., et al. "Evaluation of dried yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as an efficient probiotic carrier of *Lactobacillus casei* LC-01". **LWT**, v.75, p.220-226, 2017.

LOPES, R. P., et al. "Physicochemical and microbial changes in yogurts produced under different pressure and temperature conditions." **LWT**, v.99, p.423-430, 2019.

LÓPEZ-ALARCÓN, C; DENICOLA, A. "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays". **Analytica chimica acta**, v.763, p.1-10, 2013.

MAKKI, K., et al. "The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease". **Cell host & microbe**, v.23.6, p.705-715, 2018.

MANZONI, M. S. J., et al. "Development of a Synbiotic Low-Calorie Beverage Made from Soy and Yacon Extracts". **Food and Nutrition Sciences**, v.3, p.1500-1508, 2012.

MATAR, C., et al. "The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during *in vitro* digestion." **Journal of Dairy Science**, v.79.6, p.971-979, 1996.

MCGREGOR, R. A; POPPITT, S. D. "Milk protein for improved metabolic health: A review of the evidence". **Nutrition & Metabolism**, v.10, p.46-59, 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Database**. Fructofuranosyl nystose. CID 123133737, CID=123133737, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cid-123133737>> (accessed on Mar. 25, 2020)

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Database**. 1-Kestose, CID=440080, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Kestose>> (accessed on Mar. 25, 2020)

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Database**. Nystose, CID=166775, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nystose>> (accessed on Mar. 25, 2020)

NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. "A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides". **Food chemistry**, v.270, p.25-31, 2019.

OLIVEIRA, L. B. **Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas e nas características físico-químicas de leite fermentado simbiótico**. Dissertação de mestrado. IMT. São Caetano do Sul, SP. 2008.

PANDEY, K. R; NAIK, S. R; VAKIL, B. V. "Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review". **J Food Sci Technol**, v.52 (12), p.7577–7587, 2015.

PARK, Y. W; NAM, M. S. "Bioactive peptides in milk and dairy products: a review". **Korean journal for food science of animal resources**, v.35.6, p.831-840, 2015.

PISOSCHI, A. M; NEGULESCU, G. P. "Methods for total antioxidant activity determination: a review". **Biochem Anal Biochem**, v.1.1, p.1-10, 2011.

PEDRESCHI, R. et al. "Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics" **J. Agric. Food Chem**, v.51, p.5278-5284, 2003.

PENA, F. L., et al. "Probiotic fermented milk with high content of polyphenols: Study of viability and bioaccessibility after simulated digestion". **International Journal of Dairy Technology**, v.0, p.1-11, 2020.

PEREIRA, J. A. R., et al. "Studies of chemical and enzymatic characteristics of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its flours". **Food Science and Technology**, v.33.1, p.75-83, 2013.

PIZETTA, L. C. **Elaboração de iogurte com adição de farinha de Yacon**. Dissertação de Mestrado. UFES. Alegre. ES. 2013.

QUIGLEY, E. M.M. "Prebiotics and probiotics in digestive health". **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.17.2, p.333-344, 2019.

RE, R., et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". **Free radical biology and medicine**, v.26.9, p.1231-1237, 1999.

RIBEIRO, E; ROCHA, T. S; PRUDENCIO, S. H. "Potential of green and roasted coffee beans and spent coffee grounds to provide bioactive peptides". **Food Chemistry**, v.348, p.1-12, 2021.

ROLIM, P. M., et al. "Glycemic profile and prebiotic potential *in vitro* of bread with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour". **Food Science and Technology**, v.31.2, p.467-474, 2011.

RYAN, L; PRESCOTT, S. L. "Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion". **International journal of food science & technology**, v.45.6, p.1191-1197, 2010.

SANTANA, I; CARDOSO M. H. "Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais". **Ciência Rural**, v.38.3, p.898-905, 2008.

SARBINI, S. R; RASTALL. R. A. "Prebiotics: metabolism, structure, and function". **Funct Food Rev.**, v.3.3, p.93-106, 2011.

SAVAIANO, D. A; HUTKINS, R. W. "Yogurt, cultured fermented milk, and health: A systematic review". **Nutrition reviews**, v.79.5, p.599-614, 2021.

SHI, J., et al. "Effects of fermentation by *Lactobacillus casei* on the antigenicity and allergenicity of four bovine milk proteins". **International Dairy Journal**, v.35.1, p.75-80, 2014.

SOLIERI, L; RUTTELA, G.S; TAGLIAZUCCHI, D. "Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation". **Food Microbiology**, v.51, p.108-116, 2015.

SOUSA, S., et al. "In vitro evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential". **Food and bioproducts processing**, v.95, p.96-105, 2015.

SOUZA, J. C. B., et al. "Viabilidade da adição de *Lactobacillus casei* (LC-1) protegido com trealose e goma acácia em sorvetes". **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 22.2, p. 231-237, 2011.

SUCCI, M., et al. "Pre-cultivation with selected prebiotics enhances the survival and the stress response of *Lactobacillus rhamnosus* strains in simulated gastrointestinal transit". **Frontiers in microbiology**, v.8, p.1-11, 2017.

SWAIN, M. R., et al. "Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics". **Biotechnology Research International**, v.2014, p.1-20, 2014

TONOLO, F., et al. "Milk-derived bioactive peptides protect against oxidative stress in a Caco-2 cell model". **Food & function**, v.9.2, p.1245-1253, 2018.

VASCONCELOS, C. M. **Caracterização físico-química e sensorial de iogurte "light" com farinha de yacón (*Smallanthus sonchifolius*)**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

VASCONCELOS, C. M.; MINIM, V. P. R.; CHAVES, J. B. P. "Yogur bajo en calorías añadido con harina de yacón: desarrollo y evaluación físico-química Low-calorie yogurt added with yacón flour: development and physicochemical evaluation". **Revista chilena de nutrición**, v.39.3, p.65-71, 2012.

WADA, Y; BO L. "Effects of different industrial heating processes of milk on site-specific protein modifications and their relationship to *in vitro* and *in vivo* digestibility". **Journal of agricultural and food chemistry**, v.62.18, p.4175-4185, 2014.

WIDYASTUTI, Y; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA A. "The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation". **Food and Nutrition Sciences**, v.5, p.435-442, 2014

YANG, H., et al. "Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of *Lactobacillus*". **Food Control**, v.37, p.15-20, 2014.

ZHANG, Y., et al. "Antioxidant capacity and prebiotic effects of *Gracilaria neoagaro* oligosaccharides prepared by agarase hydrolysis". **International journal of biological macromolecules**, v.137, p.177-186, 2014.