

**UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*):
CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, BIOATIVA, FÍSICO- QUÍMICA,
MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA *IN VIVO***

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Vegetal
para a obtenção do título de *Magister
Scientiae*

CAROLINA PAULA GOUVÊA DE SOUZA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Christiane Mileib Vasconcelos

VILA VELHA

2020

CAROLINA PAULA GOUVÊA DE SOUZA

FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*): CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, BIOATIVA, FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA *IN VIVO*

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 31 de julho de 2020.


Dr^a Andressa Cristina Gainone Mendes


Profª Jackline Freitas Brilhante de

São José



Profª. Christiane Mileib Vasconcelos
(Orientadora)

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*
(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por estar sempre comigo me guiando, em todos os momentos, por ser SENHOR da minha vida e Pai amado.

Aos meus pais pelo apoio, amor e por acreditarem no meu sonho e viver ele comigo. Obrigada pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo em meu caminho e chegar aqui. Mesmo em cidades diferente, tiveram sempre presente em minha vida me ajudando em tudo. Amo muito vocês.

Ao meu irmão pelo carinho, amizade e companheirismo, pelos conselhos que me ajudaram a manter firme a minha caminhada. Te amo.

A minha orientadora Christiane Mileib pelas oportunidades e todo conhecimento que me concedeu. Sou muito grata por sua dedicação, que o fez por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e orientar. E principalmente por sempre ter acreditado e depositado confiança em mim. Sem sua orientação, apoio, confiança, amizade, não somente neste trabalho mais em todo caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível. Você é um grande exemplo para mim.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal (PPGBV) associado entre a Universidade de Vila Velha (UVV) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela possibilidade de execução desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação científica.

À Universidade de Vila Velha, em especial ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, pela oportunidade.

À Federação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa de mestrado.

À professora Patrícia Campos Bernardes, por disponibilizar o uso do laboratório ajudando na realização do trabalho.

Às minhas amigas Ana Carolina e Renata que sempre se preocuparam em saber como eu estava, me apoiando e escutaram muito nestes dois anos.

Aos colegas do LABIA, e todos os envolvidos, cujos esforços e auxílios

tornaram possível a concretização deste projeto. Ainda dentre os colegas de laboratório, obrigada Lilian, Ana Cláudia, Luana, Beatriz e Ester sem a ajuda de vocês não teria conseguido realizar este trabalho.

À Flávia pela paciência e por ter me ensinado a trabalhar com teste de toxicidade.

Aos funcionários do laboratório de química, microbiologia e a todos do Biopráticas agradeço por me auxiliarem sempre que precisei.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, ajudando a realizar meu sonho. Muito Obrigada!

ÍNDICE

RESUMO.....	ixi
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	xi
JUSTIFICATIVA	xiii
REFERÊNCIAS.....	xvii
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, NUTRICIONAL E COMPOSTOS BIOATIVOS DA BEBIDA DE YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) FERMENTADA ESPONTANEAMENTE.....	24
RESUMO.....	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Delineamento Experimental	26
2.2 Preparo das bebidas de yacon.....	26
2.3 Contagem microbiológica.....	27
2.4 Determinação da composição centesimal.....	27
2.5 Quantificação de carboidratos simples.....	28
2.6 Análises físico-químicas.....	28
2.7 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais.....	28
2.8 Determinação de ácidos fenólicos.....	29
2.9 Análise estatística	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1 Análises microbiológicas.....	30
3.2 Determinação da composição centesimal.....	32
3.3 Determinação dos carboidratos simples.....	34
3.4 Análises físico-químicas.....	36
3.5 Determinação dos compostos fenólicos totais e ácidos fenólicos.....	40
4. CONCLUSÃO.....	44
5. REFERÊNCIAS.....	44
CAPÍTULO 2 - BEBIDA DE YACON FERMENTADA ESPONTANEAMENTE: CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE EM <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> ...	55
RESUMO.....	55
1. INTRODUÇÃO	56

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.2 Preparo das bebidas de yacon.....	58
2.3 Contagem microbiológica.....	59
2.4 Determinação da composição centesimal.....	59
2.5 Quantificação de carboidratos simples.....	60
2.6 Análises físico-químicas.....	60
2.7 Determinação de compostos fenólicos.....	61
2.8 Determinação da atividade antioxidante.....	61
2.8.1 ABTS.....	61
2.8.2 DPPH.....	61
2.8.3 FRAP.....	62
2.9 Análise de toxicidade aguda em <i>C.elegans</i>	62
2.9.1 Preparo da cepa de <i>C. Elegans</i> para sincronização.....	62
2.9.2 Tratamento da cepa de <i>C. Elegans</i>	63
2.9.3 Avaliação da mortalidade e desenvolvimento dos <i>C. Elegans</i>	64
2.10. Análise estatística.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.1 Contagem microbiológica.....	65
3.2 Caracterização nutricional.....	66
3.3 Análises físico-químicas.....	68
3.4 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	70
3.5 Avaliação da toxicidade aguda por <i>C.elegans</i>	72
4. CONCLUSÃO.....	74
5. REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa com alto teor de compostos fenólicos e fibras prebióticas, ambos importantes para prevenção e/ou promoção da redução ao risco de doenças crônicas não transmissíveis. Contudo, a vida de prateleira dessa raiz é bastante reduzida e culmina com a redução desses compostos benéficos à saúde, o que pode ser evitado com uso da fermentação espontânea da bebida de yacon. Assim, o presente estudo tem como objetivo (i) produzir e avaliar as bebidas de yacon tratadas com os agentes antiescurecimento cisteína ou ácido cítrico, a partir de sua fermentação espontânea, durante 60 dias de armazenamento quanto às características microbiológicas, nutricionais, físico-químicas e de compostos bioativos, e (ii) produzir bebidas de yacon fermentadas espontaneamente e avaliá-las após 30 dias de armazenamento quanto às características microbiológicas, nutricionais, físico-químicas e de compostos bioativos e efeito toxicológico em *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Foram produzidas bebidas de yacon com 0,05% de cisteína, com 0,05% ácido cítrico e sem adição de agentes antiescurecimento. Os dados foram avaliados por ANOVA e comparados pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$) ou foram ajustados modelos de regressão. Em relação aos microrganismos todas as bebidas atingiram 10^9 UFC.ml⁻¹ após 30 dias de armazenamento. Quanto à utilização de agentes antiescurecimento, as diferenças foram pontuais, contudo, a bebida com ácido cítrico apresentou pH desejável para uma bebida fermentada o que permite inibição de bactérias indesejáveis e maior quantidade proporcional inicial de FOS e menor variação com 30 e 60 dias de armazenamento. Ainda, as bebidas apresentaram quantidade consideráveis de compostos fenólicos como ácidos clorogênico e gálico que conferem importante atividade antioxidante que trazem vários benefícios à saúde. As bebidas com 30 dias de armazenamento também demonstraram ausência de toxicidade aguda pelo *C. elegans*., indicando que elas são seguras para o consumo humano, tendo a bebida com ácido cítrico apresentado maior desenvolvimento desses vermes. Ainda, pode-se sugerir um efeito simbiótico da bebida que naturalmente possui FOS, considerados prebióticos e que podem ter favorecido na bebida, a proliferação de microrganismos benéficos à saúde, os probióticos.

Palavras-chave: Bebidas fermentadas, FOS, compostos fenólicos, *C. elegans*, yacon.

ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a tuberous root with a high content of phenolic compounds and fibers that has a prebiotic effect, both important for the prevention and / or promotion of the reduction of the risk of chronic non-communicable diseases. However, the shelf life of this root is greatly reduced and reduces the reduction of these compounds beneficial to health, or can be avoided with the spontaneous fermentation of the yacon drink. Therefore, the objective of this work was (i) to produce yacon beverages treated with anti-browning agents, cysteine or citric acid, from their spontaneous fermentation during 60 days of storage as for microbiological, nutritional, physical-chemical characteristics and bioactive compounds, and (ii) produce spontaneously fermented yacon beverages and evaluate them after 30 days of storage for microbiological, nutritional, physical-chemical characteristics and bioactive compounds and toxicological effect on *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). The yacon beverages were produced with 0.05% cysteine or citric acid and a control beverage. The data were evaluated by ANOVA and compared by the Duncan test ($p \leq 0.05$) or regression models were adjusted. In relation to microorganisms, all beverages reached 10^9 UFC.ml⁻¹ from 30 days of storage. Regarding the use of antibrowning agents, the differences were punctual, however, the drink with citric acid presented desirable pH for a fermented beverage, which allows inhibition of undesirable bacteria and higher initial proportional amount of FOS and lower variation with 30 and 60 days of storage. Furthermore, the beverages presented considerable amount of phenolic compounds such as chlorogenic and lalic acids that confer important anti-oxidative activity that bring several health benefits. Beverages with 30 days of storage also demonstrated no acute toxicity by *C. elegans*., indicating that they are safe for human consumption, and the drink with citric acid showed greater development of these vermins. In addition, it can be suggested a symbiotic effect of the drink that naturally has FOS, considered prebiotic and that may have favored in the beverage, the proliferation of microorganisms beneficial to health, probiotics.

Keywords: Fermented beverages, FOS, phenolic compounds, *C. elegans*, Yacon.

INTRODUÇÃO GERAL

Alimentos funcionais tem sido foco de muitas pesquisas considerando o aumentando de consumo voltado para uma alimentação mais saudável, e que, além de nutrir, demonstrem benefícios fisiológicos e/ou reduzam o risco de doenças crônicas (Costa, Rosa, 2016; Kaur, Singh, 2017).

Os alimentos podem ter em sua composição características funcionais presentes naturalmente ou adicionados em forma de ingredientes durante o processamento (Alkhatib et al., 2017). Um alimento que tem recebido grande importância neste contexto por apresentar naturalmente constituintes com alegação de propriedade funcional é o yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Pertencente à família *Asteraceae* originária da região dos Andes, essa raiz é considerada o alimento que contém naturalmente o maior conteúdo de frutooligossacarídeos (FOS) (Valentová, Ulrichová, 2003; Santana, Cardoso, 2008; Fujishima et al., 2009; Apolinário et al., 2014; Cao et al., 2018) podendo variar de 0,7% a 13,2% do peso fresco, dependendo do cultivo (Campos et al., 2012; Castro et al., 2013).

Os frutanos (FOS e inulina) são utilizados como aditivo funcional em alimentos devido a suas propriedades prebióticas, que favorece o crescimento de bactérias promotoras de saúde como *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, reduzindo as populações patogênicas e promovendo a imunomodulação intestinal (Whelan, 2013; Caetano et al., 2016). Dessa forma, compõe assim uma boa oportunidade de agregar valor ao produto em termos de funcionalidade e saúde (Delgado et al., 2010).

Aliado à presença das fibras prebióticas, o yacon é rico em compostos fenólicos com potencial antioxidante (Simonovska et al., 2003), protegendo as membranas celulares contra danos provocados pelos radicais livres sendo importante contra doenças como as cardiovasculares e câncer. A presença de compostos fenólicos ocorre tanto nas folhas quanto nas raízes (Valentová, Ulrichová, 2003).

Durante as etapas do processamento como corte e choque ficam expostos favorecendo a reação com as enzimas polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases (POD) presentes. Estas enzimas catalisam a oxidação dos

compostos fenólicos em quinona, levando ao escurecimento enzimático com formação de pigmentos escuros denominados melanoidinas (Queiroz et al., 2008; Padilha et al., 2009; Borges et al., 2012). A adição de agentes anti-escurecimento associada ou não a um pré-tratamento térmico, por controlar o escurecimento enzimático pode favorecer a preservação dos compostos fenólicos (Menolli et al., 2008). Os agentes antioxidantes mais utilizados em alimentos com bons resultados demonstrados são o ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido tartárico e L-cisteína (Rodrigues et al., 2013; Vasconcelos et al., 2015).

Devido à predominância de água na raiz de yacon, sua perecibilidade é reduzida e, portanto, a técnica de fermentação é uma alternativa que permite melhorar a segurança microbiológica, preservar o valor nutricional e conseqüentemente, seus compostos de interesse à saúde e, aumentar sua vida de prateleira. Produtos como queijo e iogurte são os principais alimentos fermentados probióticos utilizados atualmente (Ranadheera et al., 2018), porém, com o aumento de alimentação vegana, intolerância à lactose, alergia à proteína do leite e elevado teor de colesterol, aumentou a demanda e necessidade de alimentos probióticos não lácteos (Martins et al., 2013; Vasudha, Mishra, 2013). Como existe uma alta demanda por alimentos com propriedades funcionais em todo o mundo, a inclusão da yacon como fonte de FOS, um dos compostos comprovadamente considerados prebióticos, na produção de bebida com potencial alegação simbiótica representa uma grande oportunidade para inovação e agregação de valor na indústria de alimentos com essa alegação.

As pesquisas relacionadas ao processo de fermentação do yacon ainda são muito recentes, sendo a maioria delas realizadas por fermentação exógena, ou seja, com adição de microrganismos, como demonstrado nos estudos de Chen et al. (2019) e Dahal (2020) que adicionaram culturas probióticas. Já Reina et al., (2015) conseguiram obter um yacon por fermentação endógena, sendo identificado os microrganismos presentes, como as bactérias ácido lácticas e leveduras.

Devido à escassez de estudos voltados para a fermentação endógena de yacon, faz-se necessário fomentar mais esses conhecimentos por meio da caracterização físico-química, avaliação do teor de compostos com potencial

bioativo, além da verificação da possibilidade de consumo desse produto, através de teste de toxicidade, viabilizando testes posteriores com humanos e comercialização do produto.

Os testes toxicológicos *in vivo* utilizando *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um método muito utilizado para verificar a existência ou não de toxicidade, pois, utiliza-se um nematódeo facilmente cultivado em laboratório, devido ao seu tamanho reduzido, ciclo de vida curto e baixo custo de manutenção (Brenner, 1974). A análise da toxicidade *in vivo* utilizando o *C. elegans* possui várias vantagens em relação às análises *in vitro*, como por exemplo a cultura de células, que trata-se de um organismo multicelular, capaz de permitir que a ação dos compostos estudados sejam avaliados de forma sistêmica (Scanlan et al., 2018). Além disso, o cultivo e os experimentos realizados com este organismo são muito mais baratos, quando comparados com testes em camundongos ou outros modelos animais. Isto se deve principalmente ao fato de que, no caso do *C. elegans*, a oferta de animais não é limitante, uma vez que eles crescem rapidamente em um sistema simples e barato, onde podem ser gerados milhares de corpos em poucos dias (Charão et al., 2015; Yoshimura et al., 2019). Estas vantagens permite o desenvolvimento de estratégias de alta demanda, rápida e prática para identificação de compostos que causam alterações no *C. elegans* (Leung et al., 2008; Fitzgerald et al., 2009).

Diante de todo esse contexto e tendo em vista os benefícios relacionados ao consumo de yacon é importante buscar estratégias que aumentem o tempo de armazenamento, preservando os compostos bioativos e estimulando a proliferação de microrganismos com potencial benéfico, em uma bebida possivelmente simbiótica e toxicologicamente segura, favorecendo assim a saúde do consumidor.

JUSTIFICATIVA

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma raiz tuberosa originária da região dos Andes, vem sendo estudada devido sua composição e propriedades funcionais por conter quantidades relevantes de compostos fenólicos e frutanos (inulina e frutooligossacarídeos - FOS). Esses compostos encontrados na raiz

instigam interesse médico e nutricional (Bielecka et al., 2015; Caetano et al., 2016).

A composição química do yacon tem como principal substância os carboidratos e aproximadamente 83 a 90% de água, atribuindo um baixo valor energético por porção e vida útil reduzida (Santana, Cardoso, 2008).

A raiz tuberosa de yacon tem sido considerada um dos alimentos com maior quantidade de FOS na natureza, diferenciando das demais raízes em que os carboidratos são estocados na forma de amido. Os FOS são polímeros de frutose ligados por ligação β (2-1) com glicose terminal, encontrados principalmente em produtos de origem vegetal (Bielecka et al., 2002). Não são metabolizados pelo organismo humano, devido à falta de enzimas específicas para sua metabolização, dessa forma não são considerados calóricos. Ainda, são designados como fibras solúveis prebióticas, pois estimulam o crescimento seletivo e atividade de bactérias benéficas, predominando lactobacilos e bifidobactérias, influenciando a função intestinal e parâmetros lipídicos (Marco et al., 2017). Com o equilíbrio da flora intestinal o consumo da raiz estimula efeitos benéficos para a saúde, como redução de colesterol sérico, auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer, melhora do metabolismo de diabéticos e redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas (Pedreschi et al., 2003; Gusso et al., 2014).

Além dos constituintes nutricionais, a raiz de yacon também é rica em compostos fenólicos, que são metabólitos secundários das plantas e um dos grupos mais importantes de constituintes bioativos de frutas e hortaliças, devido às suas propriedades antioxidantes. Os compostos fenólicos possuem um importante mecanismo de ação contra alguns tipos de doenças, exercem efeitos quelantes e modulam as atividades de vários sistemas enzimáticos, apresentando efeitos benéficos à saúde (Hondo et al., 2000; Maydata, 2002; Simonovska et al., 2003; Campos et al., 2012).

Devido às características nutricionais e funcionais da raiz de yacon, a fermentação é uma alternativa interessante e vantajosa, pois é uma técnica que permite melhorar a segurança microbiológica, o valor nutricional decorrente da biossíntese microbiana de vitaminas e aminoácidos essenciais, qualidade sensorial e ainda, aumentar o tempo de armazenamento devido à produção de

metabólitos como ácido láctico, acético ou propiônico (Gálvez et al., 2007; Bourdichon et al., 2012), que servem como estratégias de conservação do alimento.

O crescimento e tipo de microrganismos presentes nos alimentos fermentados são definidos durante o processo de fermentação. A fermentação de vegetais, geralmente é dependente do desenvolvimento espontâneo de bactérias lácticas (BAL), e a temperatura, pH inicial, nutrientes presentes e concentração de sal (NaCl) são fatores relevantes para o crescimento delas (Rodríguez et al., 2009).

Normalmente utiliza-se uma concentração de NaCl de 2 a 10% dependendo do fabricante. O NaCl ajuda na proliferação de bactérias benéficas, principalmente as BAL que produzem ácido láctico, fazendo com que o pH do meio diminua e iniba o crescimento de bactérias indesejáveis (Rodríguez et al., 2009). Apesar deste tipo de fermentação ser um processo anaeróbio, alguns organismos realizam esse metabolismo mesmo na presença de grandes quantidades de oxigênio, como as leveduras (Bortolini et al., 2001; Kim et al., 2016).

As leveduras são mais utilizadas na fermentação alcoólica e podem ser classificadas como anaeróbios facultativos (Rodrigues and Sant'anna, 2001). Segundo Reina et al., (2015), a fermentação da raiz de yacon contendo 2% de NaCl é composta principalmente por bactérias lácticas e leveduras.

Em relação aos impactos na saúde provenientes de seu consumo, estudos *in vivo* evidenciam os benefícios do yacon em doenças de agravos não transmissíveis, como a melhora na alteração dos lipídeos na dislipidemia. A *American Heart Association* (AHA) enfatiza que a oferta de vitaminas, minerais, antioxidantes e fibras presentes nos alimentos ajudam a reduzir o risco de doenças cardiovasculares (NCEP, 2002).

Durante o processo de fermentação bacteriana, as fibras solúveis presentes no yacon podem ser utilizadas como substratos levando à produção, principalmente, de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), além de ácido láctico, dióxido de carbono e hidrogênio (Mira et al., 2009; Roberfroid, 2018). A produção de AGCC no colón diminui o pH, impedindo a proliferação de bactérias nocivas no intestino grosso, melhorando assim o metabolismo de lipídeos (Seminario et

al., 2003).

O estudo conduzido por Oliveira (2013) mostrou que a ingestão de extrato aquoso da raiz diminuiu colesterol total, triglicerídeos e outras lipoproteínas de baixa densidade, aumentou HDL-colesterol, promoveu efeito protetor hepático e reduziu os sintomas associados ao diabetes mellitus tipo 1. Outro estudo *in vivo* com farinha de yacon, demonstrou que uma dieta contendo 5 g de FOS em 100 g de farinha auxiliou o aumento de bifidobactérias e lactobacilos levando ao aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta na mucosa do cólon, preservando as criptas do ceco, evidenciando o potencial prebiótico na manutenção da saúde do cólon e apresentando vários indicativos benéficos à saúde intestinal (Campos et al., 2012).

Vaz-Tostes et al. (2014) avaliou a utilização da farinha de yacon na preparação de bolos, biscoitos e doces para crianças e constatou que o yacon melhorou os efeitos imunológicos com o aumento da produção de imunoglobulina A (IgA) e interleucina 4 (IL-4). Outra pesquisa obteve resultados parecidos utilizando raízes de yacon moídas e liofilizadas na dieta de camundongos, observando uma melhora do sistema imunológico e imunidade da mucosa, baseado no aumento IgA intestinal e redução de citocinas inflamatórias (Delgado et al., 2012).

Contudo, para que um produto seja comercializado, é necessário que seja garantido a ausência de toxicidade. O teste de toxicidade tem como objetivo analisar e definir quais alimentos possuem ou não potencial de causar danos à saúde humana. O potencial toxicológico de um alimento sobrevém devido à presença de um ou mais compostos presentes ou produzidos no mesmo, que podem causar danos à saúde dos seres vivos, estando diretamente relacionada com diversas condições, tais como: tempo de armazenamento do produto, sua natureza, frequência de ingestão, exposição da substância, via de introdução no organismo e susceptibilidade individual (Mídio, 2000).

Até o momento, não se sabe sobre a segurança ou toxicidade da bebida de yacon fermentada espontaneamente. Recentemente, há um número crescente de estudos sobre nanotoxicologia em *Caenorhabditis elegans*. O *C. elegans* é um modelo animal com vantagens potenciais para estudos da atividade nutracêutica como vida útil relativamente curta, fácil manutenção, baixo

custo, tamanho de ninhada e várias linhagens mutantes (Brunelli, Gastoni, 2013; Boldori, Denardin, 2017). *C. elegans* é um nematoide de vida livre utilizado como modelo experimental para estudos preliminares, pois apresenta inúmeras vantagens frente aos demais modelos, como um curto ciclo de vida (cerca de 20 dias), alta reprodutibilidade, facilidade de manutenção e genoma totalmente sequenciado, no qual apresenta uma alta homologia aos mamíferos (Hunt, 2017; Ludewig, Schroeder, 2018).

Como demonstrado anteriormente a raiz tuberosa de yacon destaca-se pela sua composição nutricional e na prevenção e diminuição das complicações de doenças de agravos não transmissíveis. Contudo, os efeitos à saúde, características e toxicidade dessa raiz sendo fermentada espontaneamente, ainda são inexistentes. Por isso, faz-se necessário estudar a fermentação espontânea da bebida de yacon, uma vez que, a fermentação estimula o crescimento de microrganismos endógenos como bactérias não patogênicas e possíveis leveduras benéficas, aumentando o valor agregado do produto, podendo potencializar os benefícios já existentes na raiz, culminando em um produto de alto potencial inovador no mercado.

REFERÊNCIAS

- Alkhatib, A., Tsang, C., Tiss, A., Bahorun, T., Arefanian, H., Barake, R., Khadir, A., Tuomilehto, J., 2017. Functional foods and lifestyle approaches for diabetes prevention and management. *Nutrients* 9, 1310.
- Apolinário, A.C., de Lima Damasceno, B.P.G., de Macêdo Beltrão, N.E., Pessoa, A., Converti, A., da Silva, J.A., 2014. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydr. Polym.* 101, 368–378.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A., Juszkiewicz, J., Wróblewska, M., 2015. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A food with multiple functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 32–40.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A., Juśkiewicz, J., Wróblewska, M., 2002. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. *Food Res. Int.* 35, 139–144.

- Boldori, J., Denardin, C.C., 2017. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de jabuticaba (*Myrciaria Cauliflora*) no modelo experimental *Caenorhabditis Elegans*. An. do Salão Int. Ensino, Pesqui. e Extensão 9.
- Borges, J.T. da S., Pirozi, M.R., Paula, C.D., Vidigal, J.G., Silva, N.A. de S., Caliman, F.R.B., 2012. Yacon na alimentação humana: aspectos nutricionais, funcionais, utilização e toxicidade. Rev. Sci. Amaz. 1, 3–16.
- Bortolini, F., Sant’Anna, E.S., Torres, R.C., 2001. comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*actinidia deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. Ciência e Tecnol. Aliment. 21, 236–243. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000200020>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. Int. J. Food Microbiol. 154, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Brenner, S., 1974. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77, 71–94. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07894.x>
- Brunelli, L.T., Gastoni, W., 2013. Avaliação físico-química e sensorial de fermentado de acerola Physicochemical and sensorial evaluation of a fermented West Indian cherry beverage 147–154.
- Caetano, B.F.R., de Moura, N.A., Almeida, A.P.S., Dias, M.C., Sivieri, K., Barbisan, L.F., 2016. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. Nutrients 8. <https://doi.org/10.3390/nu8070436>
- Campos, D., Betalleluz-Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-Galvez, A., Noratto, G., Pedreschi, R., 2012. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. Food Chem. 135, 1592–1599.
- Cao, Y., Ma, Z.F., Zhang, H., Jin, Y., Zhang, Y., Hayford, F., 2018a. Phytochemical properties and nutrigenomic implications of yacon as a potential source of prebiotic: Current evidence and future directions. Foods

7, 59.

- Castro, A., Céspedes, G., Carballo, S., Bergenståhl, B., Tornberg, E., 2013. Dietary fiber, fructooligosaccharides, and physicochemical properties of homogenized aqueous suspensions of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food Res. Int.* 50, 392–400.
- Charão, M.F., Souto, C., Brucker, N., Barth, A., Jornada, D.S., Fagundez, D., Ávila, D.S., Eifler-Lima, V.L., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Garcia, S.C., 2015. *Caenorhabditis elegans* as an alternative *in vivo* model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5093–5106. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84909>
- Chen, H., Xiao, G., Xu, Y., Yu, Y., Wu, J., Zou, B., 2019. High hydrostatic pressure and co-fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* and *Gluconacetobacter xylinus* improve flavor of yacon-litchi-longan juice. *Foods* 8, 308.
- Costa, N.M.B., Rosa, C. de O.B., 2016. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Editora Rubio.
- Dahal, S., Ojha, P., Karki, T.B., 2020. Functional quality evaluation and shelf life study of synbiotic yacon juice. *Food Sci. Nutr.* 8, 1546–1553.
- Delgado, G.T. choque, Thomé, R., Gabriel, D.L., Tamashiro, W.M.S.C., Pastore, G.M., 2012. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) -derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. *Nutr. Res.* 32, 884–892. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.09.012>
- Delgado, G.T.C., Tamashiro, W.M.S.C., Pastore, G.M., 2010. Immunomodulatory effects of fructans. *Food Res. Int.* 43, 1231–1236.
- Fitzgerald, V.K., Mensack, M.M., Wolfe, P., Thompson, H.J., 2009. Short Technical Reports. <https://doi.org/10.2144/000113277>
- Fujishima, M., Furuyama, K., Ishihiro, Y., Onodera, S., Fukushi, E., Benkeblia, N., Shiomi, N., 2009. Isolation and structural analysis *in vivo* of newly synthesized fructooligosaccharides in onion bulbs tissues (*Allium cepa* L.) during storage. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2009.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N. Ben, 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation 120, 51–70.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>

- Gusso, A.P., Mattanna, P., Richards, N., 2014. Yacon : benefícios à saúde e aplicações tecnológicas.
- Hondo, M., Nakano, A., Okumura, Y., Yamaki, T., 2000. Effects of activated carbon powder treatment on clarification, decolorization, deodorization and fructooligosaccharide content of yacon [*Polymnia sonchifolia*] juice. J. Japanese Soc. Food Sci. Technol.
- Hunt, P.R., 2017. The *C. elegans* model in toxicity testing. J. Appl. Toxicol. 37, 50–59.
- Kaur, N., Singh, D.P., 2017. RETRACTED: Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: a literature review.
- Kim, B., Hong, V.M., Yang, J., Hyun, H., Im, J.J., 2016. Review Article A Review of Fermented Foods with Beneficial Effects on Brain and Cognitive Function 21, 297–309.
- Leung, M.C.K., Williams, P.L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K.J., Aschner, M., Meyer, J.N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. Toxicol. Sci. 106, 5–28.
- Ludewig, A.H., Schroeder, F.C., 2018. Ascaroside signaling in *C. elegans*, in: WormBook: The Online Review of *C. Elegans* Biology [Internet]. WormBook.
- Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Ganzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., Hutkins, R., 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. Curr. Opin. Biotechnol. 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Martins, E.M.F., Ramos, A.M., Vanzela, E.S.L., Stringheta, P.C., de Oliveira Pinto, C.L., Martins, J.M., 2013. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. Food Res. Int. 51, 764–770.
- Maydata, A.G., 2002. Café, antioxidantes y protección a la salud. Medisan 6, 72–81.
- Menolli, L.N., Finger, F.L., Puiatti, M., Barbosa, J.M., Barros, R.S., 2008. Atuação das enzimas oxidativas no escurecimento causado pela injúria por frio em raízes de batata-baroa. Acta Sci. Agron. 30, 57–63.
- Mídio, A.F., 2000. Toxicologia de alimentos. Varela.

- Mira, G.S., Graf, H., Cândido, L.M.B., 2009. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 45, 11–20. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000100003>
- NCEP, 2002. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106, 3143–3421.
- Padilha, V.M., Rolim, P.M., Salgado, S.M., Livera, A.V.S., Oliveira, M.G. de, 2009. Avaliação do tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. *Ciência Rural* 39, 2178–2184.
- Pedreschi, R., Campos, D., Naratto, G., Chirinos, R., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp . Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics 5278–5284.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2008. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24, 361–375.
- Ranadheera, C.S., Naumovski, N., Ajlouni, S., 2018. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. *Curr. Opin. Food Sci.* 22, 109–114.
- Reina, L.D., Pérez-Díaz, I.M., Breidt, F., Azcarate-Peril, M.A., Medina, E., Butz, N., 2015. Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.007>
- Rodrigues, A.M., Sant’anna, E. s., 2001. efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida 1 21, 57–62.
- Rodrigues, M.Z., Martins, E.M.F., Brandão, V.I., Madeira, R.O., Campos, A.N. da R., Ramos, A.M., 2013. Application of antioxidants to extend the shelf life of processed minimally yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Int. J. Postharvest*

Technol. Innov. 3, 28–40.

- Rodríguez, H., Antonio, J., María, J., De, B., López, F., Felipe, D., Gómez-cordovés, C., Miguel, J., Muñoz, R., 2009. International Journal of Food Microbiology Food phenolics and lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 132, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>
- Santana, I., Cardoso, M.H., 2008. Yacon tuberous root (*Smallanthus sonchifolius*): Cultivation potentialities, technological and nutritional aspects. Ciência Rural 38, 898–905.
- Scanlan, L.D., Lund, S.P., Coskun, S.H., Hanna, S.K., Johnson, E., Sims, C.M., Brignoni, K., Lapasset, P., Petersen, E.J., Elliott, J.T., Nelson, B.C., 2018. Counting *Caenorhabditis elegans*: Protocol Optimization and Applications for Population Growth and Toxicity Studies in Liquid Medium. Sci. Rep. 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19187-3>
- Seminario, J., Valderrama, M., Manrique, I., 2003. Yacon. Basics for the use of a promising resource.
- Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K., Ulrichová, J., 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. J. Chromatogr. A 1016, 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01183-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01183-X)
- Valentová, Kateřina, Ulrichová, J., 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii*-prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. Biomed. Pap. 147, 119–130.
- Vasconcelos, C.M., de Oliveira, E.B., Rossi, S.N., Arantes, L.F., Puschmann, R., Chaves, J.B.P., 2015. Evaluating strategies to control enzymatic browning of minimally processed yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Food bioprocess Technol. 8, 1982–1994.
- Vasudha, S., Mishra, H.N., 2013. Non dairy probiotic beverages. Int. Food Res. J. 20.
- Vaz-Tostes, M. das G., Viana, M.L., Grancieri, M., Luz, T.C. dos S., Paula, P.H. de, Pedrosa, R.G., Costa, N.M.B., 2014. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children rio Grac 30, 666–672. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.016>
- Whelan, K., 2013. Mechanisms and effectiveness of prebiotics in modifying the

gastrointestinal microbiota for the management of digestive disorders. Proc. Nutr. Soc. 72, 288–298.

Yoshimura, J., Ichikawa, K., Shoura, M.J., Artiles, K.L., Gabdank, I., Wahba, L., Smith, C.L., Edgley, M.L., Rougvie, A.E., Fire, A.Z., 2019. ReCompleting the *Caenorhabditis elegans* genome. Genome Res. 29, 1009–1022.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, NUTRICIONAL E COMPOSTOS BIOATIVOS DA BEBIDA DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*) FERMENTADA ESPONTANEAMENTE

RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa com alto teor de compostos fenólicos e fibras que apresentam efeito prebiótico, ambos importantes para prevenção e/ou promoção da redução ao risco de doenças crônicas não transmissíveis. Contudo, a vida de prateleira dessa raiz é bastante reduzida e culmina com a redução desses compostos benéficos à saúde, o que pode ser evitado com uso da fermentação espontânea da bebida de yacon. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos agentes antiescurecimento sob as características físico químicas, nutricionais e microbiológicas de bebidas de yacon fermentadas espontaneamente durante 60 dias. Foram produzidas três bebidas de yacon: com 0,05% de cisteína, 0,05% de ácido cítrico, e sem adição de agente antiescurecimento (controle) e caracterizadas quanto à contagens microbiológicas, composição centesimal, teor de carboidratos simples, análises físico-químicas, compostos fenólicos totais e ácidos fenólicos. Os dados foram avaliados por ANOVA ($p \leq 0,05$) e comparados pelo teste Duncan ou ajustados modelos de regressão. Em relação aos microrganismos todas as bebidas atingiram 10^9 UFC.ml⁻¹ a partir de 30 dias de armazenamento. Quanto à utilização de agentes antiescurecimento, as diferenças foram pontuais, contudo, a bebida com ácido cítrico apresentou pH desejável para uma bebida fermentada o que permite inibição de bactérias indesejáveis e maior quantidade proporcional inicial de FOS e menor variação com 30 e 60 dias de armazenamento. Ainda, as bebidas apresentaram quantidade consideráveis de compostos fenólicos como ácidos clorogênico e gálico que conferem importante atividade antioxidante que trazem vários benéficos a saúde.

Palavras-chave: Yacon, Fermentação, FOS, Compostos fenólicos.

1. INTRODUÇÃO

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pertence à família *Asteraceae* originária da região dos Andes e possui propriedades de interesse nas áreas da nutrição, medicina e saúde, por fornecer nutrientes e compostos químicos que promovem saúde e bem-estar, além de efeito protetor para doenças (Valentová, Ulrichová, 2003).

A principal forma de consumo do yacon está relacionada à ingestão de suas raízes tuberosas *in natura*, que possuem consistência crocante e sabor adocicado (Simonovska et al., 2003; Reina et al., 2015). Quanto à sua composição química, sua biomassa fresca é constituída, em geral, de 83 a 90% de água, o que diminui consideravelmente o seu valor energético (Santana, Cardoso, 2008a).

Em relação à matéria seca, as raízes de yacon possuem grande quantidade de frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, e também, de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido cafeico (Takenaka et al., 2003; Pedreschi et al., 2003; Genta et al., 2005; Ojansivu and Lucia, 2011; Silva et al., 2017). FOS e inulina são as únicas fibras alimentares reconhecidas como prebióticas pela ANVISA; são identificados como carboidratos não-digeríveis, pois fornecem substratos que as bactérias benéficas do cólon são capazes de fermentar (ANVISA, 2002; Macfarlane et al., 2006).

Dada a composição da raiz de yacon, durante seu armazenamento, ocorre espontaneamente uma fermentação que favorece o crescimento de microrganismos, dentre eles, de bactérias do ácido láctico, havendo prevalência de heterofermentação desencadeada pelo *Leuconostoc*, em uma concentração de 2% de NaCl, além de uma considerável quantidade de leveduras (Reina et al., 2015).

Geralmente, as bactérias lácticas se desenvolvem de forma espontânea em vegetais, sendo a temperatura, pH inicial, nutrientes e concentração de sal (NaCl), fatores de relevância para a fermentação. As leveduras são mais utilizadas na fermentação alcoólica e, geralmente, conseguem fermentar tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas (Rodrigues, Sant'anna, 2001; Chaud, Sgarbieri, 2006).

A fermentação tem como finalidade melhorar a segurança microbiológica, o valor nutricional e qualidade sensorial e, ainda, aumentar o tempo de armazenamento devido à produção de metabólitos como os ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiônico), etanol, bacteriocinas, podendo ser associada com adição de sal ou secagem para a diminuição da atividade de água (Bourdichon et al., 2012; Reina et al., 2015).

A respeito da raiz de yacon, até o momento, não foram identificados estudos que avaliaram as características físico-químicas e microbiológicas desencadeada pela fermentação espontânea dessa raiz enquanto bebida. Neste contexto, o desenvolvimento de uma bebida com propriedades de alegação funcional, contendo compostos bioativos, estimulando a proliferação de microrganismos com potencial benéfico, pode promover benefícios à saúde e se tornar um produto com potencial inovador para os consumidores.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi produzir bebidas de yacon fermentadas espontaneamente e presença de agentes antiescurecimento e avaliar as características microbiológicas, nutricionais, físico-químicas e de compostos bioativos durante 60 dias de armazenamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema de parcelas subdivididas, sendo os agentes antiescurecimento (cisteína, ácido cítrico e controle) localizado na parcela, e o tempo de armazenamento (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias) nas subparcelas, com 3 repetições, totalizando 54 unidades experimentais.

2.2 Preparo das bebidas de yacon

As raízes foram obtidas no comércio local da cidade de Vila Velha/ES. As etapas de preparo foram baseadas na metodologia descrita por Vasconcelos et al. (2015) com algumas adaptações.

Primeiramente as raízes foram selecionadas para retirada daquelas impróprias para consumo, higienizadas em água corrente e descascadas manualmente. Depois foram cortadas em fatias cilíndricas de aproximadamente

2 cm e submetidas ao branqueamento à 100 °C por 4 minutos com a quantidade de agente antiescurecimento calculada para o peso de yacon.

As concentrações adicionadas às bebidas de yacon do ácido cítrico e cisteína foram de 0,05% (m/v) definidos conforme testes preliminares e o trabalho de Vasconcelos et al (2015).

As fatias foram imediatamente removidas do branqueamento, sendo a água desprezada, e colocadas em um recipiente contendo água e gelo na proporção 1:1 (m/v) yacon: água e gelo. Depois, desprezou-se novamente a água e o yacon foi triturado com 2% de NaCl, conforme utilizado por Reina et al., (2015) em mix (Walita Philips, Brasil). As bebidas foram então embaladas com 15ml em cada embalagens plásticas impermeáveis, utilizando seladora à vácuo Orved e Brock (Mod.-12) para evitar trocas gasosas, e mantidas sob refrigeração, aproximadamente 10 °C durante o tempo de armazenamento.

A bebida controle foi preparada seguindo todas as etapas anteriores, com exclusiva exceção da adição de agente antiescurecimento durante o branqueamento.

2.3 Contagem microbiológica

Nas análises microbiológicas foram utilizados os meios de cultura seletivos: *Plate Count Agar* (PCA) Biolog® para bactérias totais, *MRS Lactobacillus Kasvi*® para lactobacilos e *Ágar Sabouraud Dextrose Kasvi*® para levedura e fungos filamentosos. Os meios foram preparados segundo a orientação do fabricante e as análises realizadas conforme técnica descrita por Silva (2007), que consiste na diluição das bebidas em série, em solução salina e plaqueados. As contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por grama da Amostra (UFC/g).

2.4 Determinação da composição centesimal

A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105 °C até peso constate; proteína pelo método de Kjeldahl, empregando-se 5,75 como fator de conversão de nitrogênio em proteína; cinzas por incineração em mufla a 550 °C (e lipídeos totais pelo método de extração de Goldfish. Calculou-se o teor de carboidratos totais por diferença, subtraindo-se de 100 a soma dos valores dos demais constituintes da composição centesimal (umidade, proteína, lipídios e

cinzas) (AOAC, 2005). O valor calórico da bebida de yacon em estudo foi calculado a partir dos fatores de conversão de Atwater: 4 kcal.g⁻¹ para proteínas e carboidratos e 9 kcal.g⁻¹ para lipídios (Watt, Merrill, 1964).

2.5 Quantificação de carboidratos simples

O teor de sacarose, frutose, glicose e manitol das bebidas fermentadas de yacon foram determinados por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) segundo Silva et al. (2013) e Evangelista et al. (2015), com algumas adaptações.

Eppendorfs com 2 ml de cada amostra foram colocados na centrífuga (Heraeus Megafuge 16R[®]) a 10.000 rpm por 10 minutos a 10 °C. O sobrenadante passou por microfiltração em filtro de acetato de celulose de 0,2 µm para remoção da fração insolúvel. A separação dos açúcares foi realizada por uma coluna (Aminex HPX-87C de 250 cm x 4 mm) a 55 °C. Foi utilizada uma fase móvel constituída de 266 µl de ácido sulfúrico por litro de água ultrapura, a um coeficiente de vazão de 0,8 ml.minuto⁻¹. Vinte microlitros de amostra foram injetados e corridos durante 35 min. Pelo detector de índice de refração (RID) os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção de padrões (manitol, frutose, glicose e sacarose – Sigma Aldrich[®]) previamente injetados e quantificados pela área dos picos observados nos cromatogramas. Os resultados foram expressos como a porcentagem da área do pico.

2.6 Análises físico-químicas

O pH foi aferido com a introdução direta de eletrodo na amostra. O medidor foi devidamente calibrado (AOAC, 2000).

O teor de sólidos solúveis totais (SST) e densidade foram realizados segundo o método AOAC (1997) pelo refratômetro modelo RTP 20 ATC, sendo os resultados expressos em °Brix e g.cm⁻³, respectivamente (AOAC, 1997).

A acidez total titulável foi determinada por meio da titulação da bebida com solução de hidróxido de sódio 0,01M até obtenção de coloração rósea (1997).

2.7 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método

utilizado por Bloor (2001), com algumas modificações. A extração foi realizada pesando 1 g de amostra em tubo falcon com proteção da luz, adicionando 10 ml de metanol (MeOH): água (60:40 v/v) e em seguida, foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min (marca Fanem®, modelo Excelsa i 2206). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o volume, diluído até 15 ml. Em uma placa de 96 poços foi adicionado uma alíquota de 100 µl da amostra, 100 µl do reagente Folin Ciocalteu a uma concentração de 20% e, em seguida, de 100 µl de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5%. Após 30 min foi realizada a leitura a 765 nm em espectrofotômetro SpectraMax®190. A curva de calibração foi preparada utilizando como padrão o ácido gálico, nas concentrações de 0 a 1000 mg.ml⁻¹. A partir da equação da reta obtida na curva padrão ($y = 0,2528x + 0,0698$, $R^2 = 0,9990$) foi realizado o cálculo do teor de compostos fenólicos totais, sendo os resultados expressos em mg EAG por grama de bebida.

2.8 Determinação de ácidos fenólicos

Para a identificação dos compostos fenólicos ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeíco, ácido sirínico, ácido coumárico e ácido ferúlico foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Breeze, Waters) acoplado a um detector UV (Waters 2489) e coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm; GL Sciences). As condições cromatográficas foram baseadas no trabalho descrito por Brunetto et al. (2007) com modificações. As bebidas foram filtradas em membrana de 0,45 µm antes da injeção no HPLC. Os compostos foram separados utilizando como fase móvel metanol 30% com ácido acético 0,1% (v/v) em condição de eluição isocrática. As corridas tiveram tempo total de 12 minutos com vazão de 1,4 ml.minuto⁻¹. Os cromatogramas foram monitorados por UV nos comprimentos de onda de 274 nm para ácido gálico e ácido sirínico, e 325 nm para ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-coumárico e ácido ferúlico. O método utilizado teve linearidade de $R^2 > 0,99$ para todos os compostos encontrados, o Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ) ficaram na faixa de 0,25 µg.ml⁻¹ a 0,52 µg.ml⁻¹ e 0,50 µg.ml⁻¹ a 1,03 µg.ml⁻¹, respectivamente.

2.9 Análise estatística

Os efeitos principais (Agentes antiescurecimento e Tempo) e de interação (Agentes antiescurecimento*Tempo) sobre as variáveis respostas foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA), a 5% de probabilidade. Para os resultados que apresentarem $p \leq 0,05$, referentes ao tempo, foram utilizadas equações de regressão múltipla linear ou quadrática, para analisar os efeitos das variáveis independentes do processo nas respostas (y_i). Os resultados significativos ($p \leq 0,05$) em relação aos agentes antiescurecimento, as médias foram comparadas pelo teste Duncan na mesma probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SAS, versão online.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises microbiológicas

Não foi possível observar diferença estatística ($p > 0,05$) entre as bebidas de yacon com e sem agente antiescurecimento, ou seja, independente da presença de cisteína ou ácido cítrico, todas tenderam a ter um comportamento similar em relação à quantidade de microrganismos totais, bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos filamentosos, como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios do crescimento de microrganismos (UFC.ml⁻¹) das bebidas de yacon fermentada, nos diferentes meios de cultura, durante o tempo de armazenamento.

Análises	Dias					
	Bebidas	7	15	30	45	60
Bactérias totais	Controle	$5,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$6,4 \times 10^9$
	Cisteína	$2,9 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7$	$7,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
	A. cítrico	$8,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$
Bactérias ácido láctico	Controle	$3,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$6,1 \times 10^8$	$8,8 \times 10^9$	$4,3 \times 10^9$
	Cisteína	$4,3 \times 10^6$	$4,2 \times 10^7$	$6,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{10}$
	A. cítrico	$4,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$6,0 \times 10^8$	$7,8 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$
Leveduras e fungos filamentosos	Controle	$7,0 \times 10^5$	$3,9 \times 10^7$	$3,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^9$
	Cisteína	$1,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	$7,5 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$
	A. cítrico	$8,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$8,4 \times 10^8$	$4,9 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$

Apesar do crescimento semelhante, independentemente do tipo de bebida, houve diferença ($p \leq 0,05$) na quantidade de microrganismos, durante o tempo de armazenamento. Entretanto, não foi possível ajustar um modelo de equação para explicar o crescimento em função do tempo de armazenamento.

De acordo com a cinética de fermentação tem-se um tempo de adaptação dos microrganismos ao meio, fase essa em que estes se encontram em um estado de latência. Após esse período, a multiplicação dos microrganismos ocorre em maior velocidade, dada a maior atividade metabólica dos mesmos (Kim et al., 2016). As bebidas atingiram seu ápice de multiplicação entre 30 e 45 dias de armazenamento, nos 3 grupos de microrganismos analisados com 10^9 UFC.ml⁻¹ nas 3 bebidas de yacon, ou seja, a adição de ácido cítrico ou cisteína não foi fator quantitativamente relevante no favorecimento ou inibição do crescimento dos microrganismos.

Normalmente, nas fermentações vegetais ocorrem o crescimento espontâneo de bactérias nativas do ácido láctico (BAL), com variações na quantidade a depender da temperatura, pH inicial, nutrientes e sal (NaCl) (Fleming et al., 1995). O NaCl favorece o crescimento das BAL que produzem ácido láctico e, conseqüentemente, reduzem o pH do meio, inibindo a proliferação de bactérias indesejáveis concorrentes (Rodríguez et al., 2009a).

O estudo com yacon fermentado conduzido por Reina et al. (2015) encontrou resultados semelhantes com predomínio BAL (10^9 UFC.g⁻¹) por 30 dias de fermentação. Foram identificados três tipos de *Leuconostoc spp.*, sendo elas *mesenteroides*, *pseudomesenteroides* e *citream*.

Krüger et al. (2008) relatam que para os microrganismos garantirem efeitos funcionais é necessário produzir culturas viáveis em concentrações efetivas, estimando ser entre 10^8 a 10^{11} UFC.g⁻¹ de produto. Já outros autores afirmam que a sobrevivência das bactérias probióticas no produto final deve ser acima de 10^6 UFC.g⁻¹ de produto para ser de importância fisiológica ao consumidor (Mattila-Sandholm et al., 2002; Maruyama et al., 2006).

Recentemente, a ANVISA (2020) publicou que a alegação de propriedade funcional ou de saúde deve ter comprovação de eficácia baseada em evidências científicas robustas, construídas por meio de estudos clínicos, randomizados, duplo-cego e placebo controlados cujos desfechos demonstrem a relação

proposta na alegação entre o consumo do produto e o efeito funcional. No caso de produtos com mais de um microrganismo ou de produtos que misturem fibras prebióticas com microrganismos, a comprovação do efeito probiótico deve ser feita para a combinação. Sendo assim, dada a quantidade de microrganismos existentes e a presença de fibra prebiótica na raiz, em especial os frutooligosacarídeos, é provável que se tenha uma bebida simbiótica, mas são necessários outros estudos para confirmação.

3.2 Determinação da composição centesimal

A composição centesimal das bebidas de yacon foi determinada apenas no tempo 0, ou seja, logo após processamento, portanto, elas ainda não estavam sofrendo o processo de fermentação.

As médias da composição centesimal e o valor calórico total das bebidas de yacon tratadas com os agentes antiescurecimento podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos resultados de composição centesimal (g.100 g⁻¹) e valor calórico total (VCT – kcal.100 g⁻¹) das bebidas de yacon com e sem agentes antiescurecimento, logo após processadas.

Constituintes	Controle	Ácido cítrico	Cisteína
Umidade	83,64 ± 1,79 ^b	91,11 ± 2,38 ^a	91,42 ± 0,94 ^a
Carboidratos	8,85 ± 1,22 ^a	6,54 ± 0,454 ^b	7,45 ± 0,60 ^b
Proteínas	0,15 ± 0,05 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,04 ^a
Lipídeos	1,34 ± 0,69 ^a	1,47 ± 0,64 ^a	1,53 ± 0,50 ^a
Cinzas	2,02 ± 0,45 ^a	1,73 ± 0,46 ^a	1,79 ± 0,45 ^a
VCT	35,57 ± 4,87 ^a	26,44 ± 1,93 ^b	30,19 ± 2,42 ^b

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Duncan.

Umidade e carboidratos variaram significativamente ($p \leq 0,05$), possivelmente devido à variação intrínseca no teor de umidade das raízes. Contudo, os valores encontrados estão condizentes com a literatura, onde estudos comprovam elevado teor de umidade da raiz, podendo exceder 70% do seu peso fresco, conferindo um baixo valor energético (BORGES et al., 2012; Gusso et al., 2015; Marcon et al., 2019).

Como esperado, as bebidas de yacon tem como predomínio em sua constituição os carboidratos (Santana, Cardoso, 2008a; Kotovicz, 2011), dentre eles glicose, frutose e sacarose, que podem ser utilizados como fontes de carbono, para os microrganismos, para produção de outros compostos como ácido láctico e acético (Reina et al., 2015), resultado da fermentação.

As bebidas de yacon apresentaram baixas quantidades de proteína, lipídeos e cinzas, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre elas. Os teores de proteína podem ainda ser reduzidos devido a uma possível hidrólise durante o processo de fermentação (Asquieri et al., 2008).

A composição centesimal das bebidas se assemelha aos estudos de Lachman et al.(2003) e Asquieri et al.(2020) com yacon fresco, que encontrou uma variação de 3,33 a 3,50 % para cinzas, 0,15 a 4,29 para proteína, 0,80 a 1,50 de lipídeos, contudo, é importante salientar que a composição do yacon pode ter uma variação expressiva em função da época do cultivo, condições ambientais no local em que foi cultivado, período da colheita, tempo, temperatura e condições de armazenamento pós-colheita; fatores que provocam variações, especialmente, na quantidade de carboidratos digeríveis e fibras, além de outros compostos quando comparados à literatura (Vilhena et al., 2000; Graefe et al., 2004).

A raiz de yacon tem valor energético considerado baixo devido à elevada concentração de água (Lewu et al., 2010) e inferior quando comparado à outras raízes e tubérculos, que tem como fonte de energia o amido, como mandioca e batata inglesa que possuem em torno de 91,78 kcal (Lewu et al., 2010). Dentre os açúcares encontrados no yacon estão os monossacarídeos frutose e glicose; o dissacarídeo sacarose; além das fibras FOS e inulina (VANINI et al., 2009; RICARTE et al., 2020), sendo que essas fibras, não fornecem calorias de forma direta ao organismo.

Diante destas características, o consumo de yacon por portadores de diabetes inclui o aumento da absorção de glicose nos tecidos periféricos, diminuição da gliconeogênese, melhor tolerância à insulina no fígado e aumento da secreção de insulina no pâncreas (Russo et al., 2015; Caetano et al., 2016).

3.3 Determinação dos carboidratos simples

Durante as análises cromatográficas dos açúcares nas bebidas de yacon não foram identificadas, pela metodologia utilizada, presença de sacarose e manitol. Os resultados das áreas cromatográficas obtidas para cada açúcar foram comparados com a área total de cada bebida, no respectivo tempo, e apresentados na forma de porcentagens. Da mesma forma, foram comparadas as áreas totais das curvas nos tempos 30 e 60 em relação a área no tempo 0 para avaliação do quanto aumentou ou reduziu o teor de carboidratos totais (Tabela 3).

Tabela 3. Valores percentuais em relação à área das curvas cromatográficas geradas na determinação de carboidratos das bebidas de yacon com e sem agentes antiescurecimento, durante o armazenamento e valores proporcionais (Vp) da área total das bebidas nos 30 e 60 dias de armazenamento, em relação ao tempo 0.

Bebidas	Carboidratos	Tempo de armazenamento				
		0	30	60	Vp ₀₋₃₀	Vp ₀₋₆₀
Controle	Glicose	4,70	0,95	ND		
	Frutose	10,72	ND	ND	+14,4%	- 2,8%
	FOS	84,59	99,05	100,00		
Cisteína	Glicose	35,83	ND	ND		
	Frutose	15,11	ND	ND	+17,7%	- 4,8%
	FOS	49,06	100,00	100,00		
Ácido cítrico	Glicose	3,38	ND	ND		
	Frutose	6,53	ND	ND	- 5,0%	- 2,5%
	FOS	90,09	100,00	100,00		

*ND: não detectado.

Em todas as bebidas tem-se o predomínio de FOS, como já esperado, pois esse é o constituinte de maior peso e importância nas raízes de yacon (Ojansivu, Lucia, 2011; Vasconcelos et al., 2015; Silva et al., 2017). Também observa-se a redução, especialmente, da frutose e glicose com o tempo de armazenamento, sendo que, na avaliação realizada com 30 dias a quantidade desses carboidratos não foi detectada, com exceção da bebida controle em baixos teores, sugerindo consumo pelos microrganismos presentes nas bebidas.

Reina et al. (2015) na avaliação de yacon fermentado espontaneamente também observaram redução nas quantidades de glicose e frutose, de 4,3 e 2,7 vezes, respectivamente em 2 dias de fermentação. Mas a partir de 7 dias de fermentação não detectaram frutose e depois, com 30 dias, a glicose, corroborando nossos achados. A maioria das bactérias lácticas obtém energia somente a partir do metabolismo de moléculas de açúcares (Madigan et al., 2010).

As cadeias de FOS são instáveis em determinadas condições de processo, e sua composição final no produto depende das etapas utilizadas no processamento, como temperatura, pH e tempo de armazenamento, além da matriz alimentar e grau de polimerização dos FOS (Veja, Zuniga-Hansen, 2015; Campos et al., 2016; Topolska et al., 2017).

O branqueamento prejudica a estabilidade dos FOS devido à hidrólise principalmente de GF3, GF4 e GF5 (Campos et al., 2016). Sendo assim, a quantidade maior de frutose em relação à glicose no tempo 0 pode ser resultado da hidrólise decorrente dessa etapa do processamento. Por outro lado, durante o processo de fermentação das bebidas ocorre a redução do pH, que é consistente com o envolvimento de prótons no processo de degradação e, portanto, com um mecanismo de catálise ácida dos FOS, cadeias instáveis em condições ácidas (Matusek et al., 2009), condizente com a redução esperada durante o armazenamento.

No entanto, observa-se aumento da quantidade de carboidratos (maior área total) no tempo 30 (V_{p0-30}) para as bebidas controle e adicionada de cisteína. Carboidrato esse que pode ser considerado FOS, pois as quantidades de glicose e frutose não foram detectadas.

As BAL pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* são relatadas como produtoras de frutossiltransferases (FTFs) (Monsan et al., 2001; Tieking et al., 2003; Malik et al., 2009; Malang et al., 2015). Essas enzimas podem catalisar a transferência de frutose tanto da sacarose quanto da rafinose para aceptores variáveis. Na presença de diferentes monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos como aceptores da atividade de transferência pode levar à síntese de FOS (van Hijum et al., 2001). A natureza da enzima, o tipo e a concentração de aceptores, a temperatura e o pH da reação influenciam a quantidade e as massas moleculares dos

oligossacarídeos sintetizados (Van Hijum et al., 2002; Korakli et al., 2003; Korakli and Vogel, 2006). Como FOS são instáveis ao pH, esse pode ter sido o fator limitante para a produção e hidrólise das cadeias que apresentaram baixa redução aos 60 dias de armazenamento. Esse resultado concorda com os dados observados para crescimento microbiológico, que demonstrou tendência à estabilização entre 30 e 45 dias de armazenamento.

Não apenas bactérias, mas algumas espécies de fungos e leveduras também são capazes de sintetizar FOS (Antosova, Polakovic, 2001), e nas bebidas foram encontradas elevadas unidades formadoras de colônias de leveduras, no entanto, ainda não foram identificadas quais estão presentes na fermentação de yacon.

A bebida com ácido cítrico teve inicialmente uma proporção maior de FOS e menor oscilação do teor de carboidratos durante 60 dias de fermentação. Várias BAL podem decompor ácido cítrico produzindo ácido lático, mas também ácido acético e outros produtos (García-Martínez et al., 2012; Moreno, Peinado, 2012), sugerindo a utilização não apenas dos carboidratos dessa bebida, mas também do ácido cítrico como substrato.

Os resultados aqui obtidos indicam que é possível ter uma bebida com até 60 dias de armazenamento com presença de FOS que possui alegação de prebiótico e de BAL, com potencial probiótico (ANVISA, 2002). Mas novos estudos são necessários para confirmar a possibilidade de um produto simbiótico.

3.4 Análises físico-químicas

As médias e desvio padrão de pH, sólidos solúveis totais (SST), acidez e densidade das bebidas fermentadas de yacon tratadas com os agentes antiescurecimento podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Média e desvio padrão das análises físico-químicas das bebidas de yacon com e sem agentes antiescurecimento.

Análises	Controle	Ácido cítrico	Cisteína
pH	4,38 ± 0,82 ^{ab}	4,13 ± 0,44 ^b	4,52 ± 0,72 ^a
Acidez (ml.g ⁻¹)	3,12 ± 1,33 ^a	2,54 ± 1,05 ^a	2,94 ± 1,79 ^a
SST (°Brix)	6,18 ± 0,77 ^a	5,43 ± 0,88 ^a	5,67 ± 0,72 ^a
Densidade (g.cm ⁻³)	1,04 ± 0,01 ^a	1,04 ± 0,01 ^a	1,04 ± 0,01 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste de Duncan.

Apenas o pH apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as bebidas com e sem agentes antiescurecimento. A bebida fermentada com adição de ácido cítrico obteve média menor de pH que a bebida com cisteína ($p \leq 0,05$), provavelmente devido a forte capacidade de acidificação com seus baixos valores de pKa ($pK_1 = 3,12$; $pK_1 = 3,13$, respectivamente), contrapondo com a cisteína que apresenta um pka de 8,3, por isso seu pH foi próximo ao bebida controle (Rosa et al., 2007; Rodrigues et al., 2014).

A variação de pH observada nas bebidas de yacon encontra-se de acordo com a faixa de pH ótimo, de 4 a 4,5, para conduzir uma boa fermentação e exigido pelas diretrizes de segurança (Lopes et al., 2005; Reina et al., 2015).

O pH ainda variou em função do tempo e na interação Agente antiescurecimento*Tempo, entretanto, para nenhuma dessas fontes de variação foi possível ajustar equações lineares ou quadráticas, sendo assim, foram plotados gráficos com os resultados médios obtidos. Para avaliação da influência do tempo em relação ao pH de cada bebida foi plotado o gráfico da Figura 1.

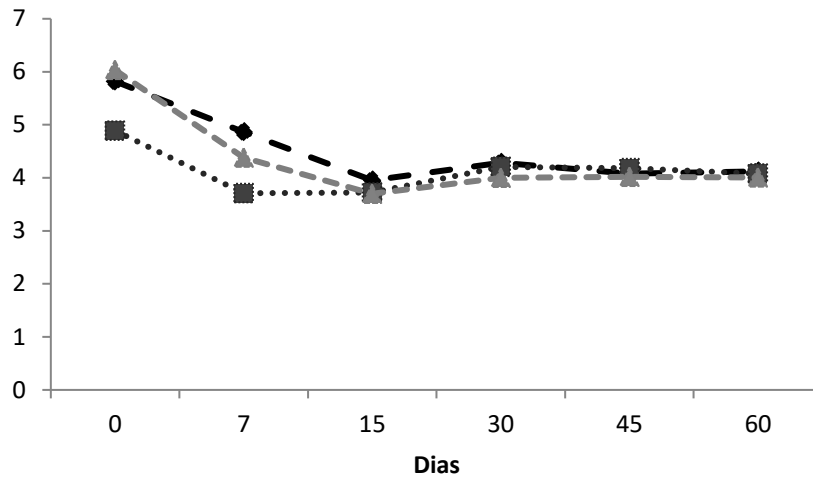


Figura 1. Variação de pH, durante o tempo de armazenamento, para cada bebida de yacon.
 --●-- Bebida com cisteína; ...■... Bebida com ácido cítrico; --▲-- Bebida controle.

É possível observar a redução gradativa do pH da bebida fermentada de yacon durante o tempo de armazenamento, especialmente para as bebidas controle e com cisteína, que apresentavam pH inicial superior. Essa diminuição coincidiu com o crescimento de microrganismos, atingindo um equilíbrio após 15 dias de fermentação, independente do agente antiescurecimento utilizado. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de yacon fermentado que iniciou com o pH de 5,77 e após 7 dias de fermentação, o pH chegou a 3,71, diminuição diretamente relacionada com o crescimento de bactérias ácido lácticas (Reina et al., 2015). Em outros alimentos esse comportamento de redução de pH também foi observado como em leite fermentado por *L. casei*, de 5,59 para 4,60 (Hu et al., 2018) e em iogurtes de 4,51 para 4,40, ambos após 28 dias de armazenamento a 4 °C (Akalin et al., 2004) confirmando o metabolismo ativo das bactérias mesmo em temperaturas refrigeradas.

A Figura 2 demonstra o comportamento geral das bebidas de yacon, em função do tempo, para as análises físico-químicas realizadas.

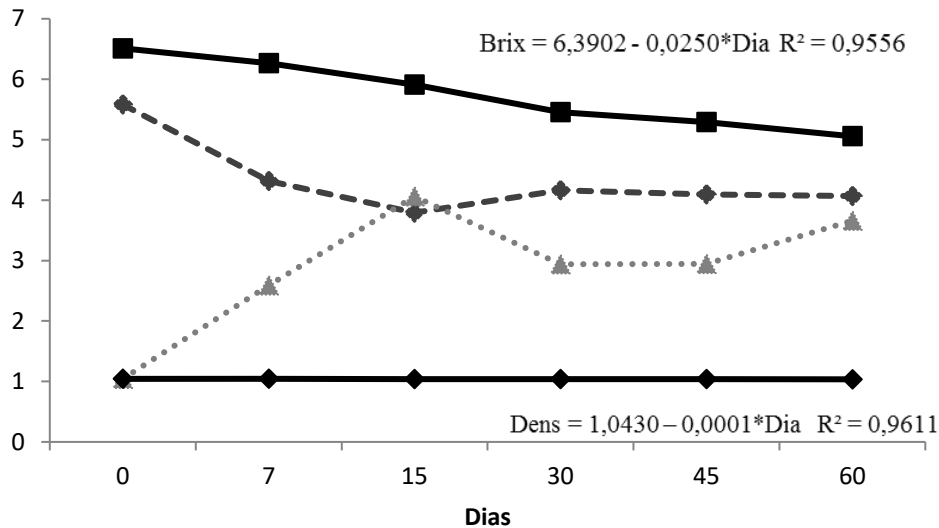


Figura 2. Comportamento das análises físico-químicas de bebida de yacon, durante o tempo de armazenamento.

—■— SST (°Brix); --●-- pH; ..▲.. Acidez (ml/100 g de bebida); ___◆___ Densidade (g/cm³).

Com a diminuição do pH, houve um rápido aumento da acidez no início da fermentação das bebidas de yacon, o que pode favorecer a redução de bactérias deteriorantes, como por exemplo do gênero *Clostridium*. Já a lenta acidificação limita o processo de fermentação pelo crescimento de bactérias butíricas (Kohajdová, 2006) que são importantes, mas na fabricação de queijos.

Durante a fermentação dos açúcares utilizados como fonte de carbono são originados os metabólitos ácidos acético e láctico, caracteristicamente produzidos por *L. mesenteroides* heterofermentativos em fermentações naturais (Saha, Racine, 2011).

As bebidas fermentadas de yacon não diferiram significativamente quanto ao teor SST ($p > 0,05$). Valores similares foram encontrados no estudo de Muniz et al. (2002) que evidenciou uma redução gradual no Brix durante todo o período de fermentação de mosto de ata, ciriguela e mangaba, os quais estabilizaram-se entre 5,4 e 6,5 °Brix.

A redução de SST durante o tempo de armazenamento ocorre devido à utilização de açúcar como substrato para fermentação microbiológica pelas bactérias ácido lácticas e leveduras presentes nas bebidas (Yoon et al., 2006).

A temperatura de armazenamento, aproximadamente 10 °C, pode ter tornado o consumo do substrato e metabolismo mais lento e gradual. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de 7 a 18 dias, com adição de

leveduras como no fermentado de umbu por Paula et al. (2012), no fermentados de sucos de vegetais por Kohajdová (2006) e no fermentado de laranja por Corazza (2001).

A densidade apresentou discreta redução durante o período de armazenamento. Isto se deve ao fato de que a densidade se relaciona diretamente com o teor de SST (Rizzon et al., 2005), que na bebida fermentada de yacon são constituídos predominantemente por carboidratos. Sendo assim, conforme ocorreu a redução dos SST observou-se também a redução da densidade.

3.5 Determinação dos compostos fenólicos totais e ácidos fenólicos

Foram avaliados nas bebidas de yacon o teor de compostos fenólicos totais e mais 6 compostos individuais - ácido gálico, ácido siríngico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-coumárico e ácido ferúlico. No entanto, foi possível identificar e quantificar apenas 2 ácidos fenólicos nas bebidas de yacon, sendo eles o ácido gálico e ácido clorogênico. Tanto o teor de compostos fenólicos totais, quanto de ácido gálico e clorogênico diferiu estatisticamente entre as bebidas de yacon ($p \leq 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão do teor de compostos fenólicos totais (CFT - mg EAG.g⁻¹), ácido gálico (µg.ml⁻¹) e ácido clorogênico (µg.ml⁻¹) das bebidas de yacon com e sem agentes antiescurecimento.

Análises	Controle	Ácido cítrico	Cisteína
CFT	0,52 ± 0,20 ^a	0,38 ± 0,16 ^b	0,48 ± 0,20 ^{ab}
Ácido gálico	285,44 ± 3,54 ^a	40,87 ± 1,32 ^c	198,30 ± 2,01 ^b
Ácido clorogênico	434,20 ± 52,58 ^a	230,37 ± 168,63 ^c	251,16 ± 138,13 ^b

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Duncan.

O teor de compostos fenólicos médio das bebidas fermentadas de yacon apresentou valores inferiores comparado com a quantidade encontrada na matéria fresca (cerca de 2 mg.g⁻¹), relatado por outros autores (Simonovska et al., 2003; Gusso et al., 2015).

Algumas espécies de microrganismos como os *Lactobacillus fermentum*, são capazes de metabolizar compostos fenólicos em alimentos fermentados por

descarboxilação e/ou atividade de redução (Campos et al., 2009; Svensson et al., 2010). No entanto, apesar desse menor valor, os teores se aproximam de algumas frutas como maracujá (0,21 mg EAG.g⁻¹), goiaba (0,83 mg EAG.g⁻¹), mamão (0,53 mg EAG.g⁻¹) e abacaxi (0,38 mg EAG.g⁻¹) (Rocha et al., 2011; Alves et al., 2017).

A bebida controle apresentou os maiores teores ($p \leq 0,05$) de compostos fenólicos, ácido gálico e clorogênio, apenas com semelhança à bebida com cisteína no teor de compostos fenólicos totais ($p > 0,05$).

Durante o processamento e armazenamento, ocorre a ruptura das estruturas celulares que contém as enzimas e os substratos fenólicos da raiz, em compartimentos distintos. Essas enzimas oxidativas começam então a catalisar a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, que por sua vez, se polimerizam formando compostos de coloração escura, denominados melanoidinas levando, portanto, degradação dos compostos fenólicos (Pereira, Gibson, 2002; Zardo et al., 2008; Mizobutsi et al., 2010; Dionisio et al., 2016).

É possível que tenha ocorrido a inativação das enzimas oxidativas em presença de ácido cítrico ou cisteína evitando o escurecimento das respectivas bebidas e, conseqüentemente, a preservação dos compostos fenólicos (Campos et al., 2009; Sekwati-Monang, Gänzle, 2011). No entanto, as bactérias do ácido láctico, uma parte importante da microbiota de fermentação de alimentos e bebidas vegetais fermentadas (Di Cagno et al., 2013; Reina et al., 2015), assim como encontrado nas bebidas de yacon, possuem capacidade de metabolizar antioxidantes, inclusive com síntese de outros produtos, afetando o perfil de compostos fenólicos, ácido gálico e ácido clorogênico (Rodríguez et al., 2009a; Cueva et al., 2010; Curiel et al., 2010; Filannino et al., 2015; Pereira et al., 2016; Lago, Noreña, 2017), indo de encontro com os resultados encontrados no presente trabalho, reduzido teor de compostos e ácidos fenólicos, sem prejuízo da cor natural das bebidas com agente antiescurecimento.

O tempo de armazenamento também afetou ($p \leq 0,05$) o conteúdo de compostos fenólicos das bebidas, de forma geral, independente da bebida, mas não foi possível ajustar um modelo de equação linear ou quadrático para explicar esse comportamento, sendo a sua tendência plotada em um gráfico (Figura 3).

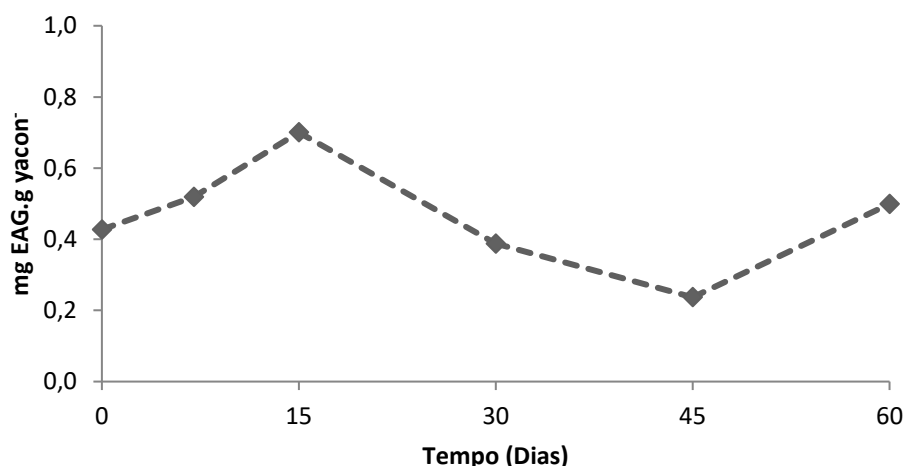


Figura 3. Variação média do teor de fenólicos (mg EAG.g yacon⁻¹) da bebida fermentada de yacon em função do tempo de armazenamento.

Houve um aumento na quantidade de fenólicos até o 15^o dia de armazenamento e após esse período, uma tendência de redução destes teores, culminando em uma suave oscilação. As enzimas oxidativas, além da forma ativa presente no citosol, também são encontradas de forma latente, tanto no citosol quanto em plastídios, isolado do restante da célula (Sellés-Marchart et al., 2006; Queiroz et al., 2011; Carvalho, Orlanda, 2017). Essas enzimas na forma latente e os plastídios ainda íntegros, quando armazenados sob refrigeração, podem sofrer modificações ao longo do tempo, levando ao rompimento dos plastídios e oxidação dos compostos fenólicos. Associado a isso, também existe o metabolismo secundário das células que leva a ciclos formadores de compostos fenólicos e, provavelmente esses ciclos podem ter sido ativados durante o armazenamento refrigerado e pelo estresse causado durante o preparo da bebida (Ding et al., 2001; Ferreres et al., 2009).

No entanto, para que as reações de escurecimento ocorram, é necessário presença de oxigênio e as bebidas foram seladas à vácuo, o que sugere que, a partir do momento em que o oxigênio dissolvido na bebida acaba, cessa as reações enzimáticas.

Ácido clorogênico também reduziu com o tempo de armazenamento ($p \leq 0,05$), tanto na interação (Agentes antiescurecimento*Tempo) como em relação ao comportamento geral (Tempo), sendo possível observar pelos modelos de regressão ajustados (Tabela 6). É importante salientar que o ácido

gálico foi encontrado apenas no Tempo 0, não sendo detectado nos demais dias de análises em nenhuma bebida.

Tabela 6. Modelo de regressão para o ácido clorogênico ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) das bebidas fermentadas de yacon em função do tempo (T) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p).

Bebida	Modelo de Regressão	R^2	Prob > F
Controle	$493,3827 - 1,9728 \cdot T$	0,9999	<0,0001
Cisteína	$378,9044 - 4,2582 \cdot T$	0,6459	<0,0001
Ácido Cítrico	$424,6194 - 6,4748 \cdot T$	0,9999	<0,0001
Comportamento geral	$432,3022 - 4,2353 \cdot T$	0,9439	0,0003

O consumo de alimentos que contenham ácido clorogênico confere benefícios a saúde, porém, sem sua metabolização esses benefícios são reduzidos, pois, a mucosa gastrointestinal humana não possui esterases capazes de hidrolisar os ácidos esterificados, reduzindo significativamente a eficiência de absorção desse ácido no lúmen gástrico e no intestino delgado (Manach et al., 2004; Farah et al., 2008). Contudo, na bebida de yacon este ácido pode ser metabolizado formando ácido hidroxicinâmico pelos microrganismos durante o tempo de fermentação (Olthof et al., 2001; Rechner et al., 2002; Adam et al., 2002). Assim, a hidrólise do ácido clorogênico torna-o mais biodisponível para o organismo, que por sua vez, será melhor absorvido pelo trato gastrointestinal promovendo benefícios a saúde.

Mesmo diante da redução dos compostos fenólicos com o tempo de armazenamento, as bebidas fermentadas de yacon apresentaram consideráveis quantidades, dentre eles os ácidos clorogênico e gálico, que possuem importante atividade antioxidante (Simonovska et al., 2003; Valentová, Ulrichová, 2003). O consumo de alimentos que contenham compostos fenólicos trazem benefícios auxiliando na atividade anti-inflamatória, antiplaquetária, além de impedir a ação dos radicais livres (Angelo, Jorge, 2007; Silva et al., 2010; Caleja et al., 2017; Taamalli et al., 2019; Yan et al., 2019) e, possivelmente, esses benefícios podem ser observados com o consumo dessa bebida fermentada espontaneamente.

4. CONCLUSÃO

A fermentação espontânea foi uma técnica de preparo que agregou valores nutricionais a bebida de yacon. Em relação aos microrganismos todas as bebidas atingiram 10^9 UFC.ml⁻¹ a partir de 30 dias de armazenamento, que pode ser considerado um alimento com propriedades funcionais, dada a identificação dos microrganismos já identificados e relatados na literatura. Considerando a quantidade de microrganismos existentes e fibras prebióticas como FOS, é possível que se tenha uma bebida simbiótica, contudo, faz-se necessária comprovação para garantir essa hipótese.

Em relação à utilização de agentes antiescurecimento, as diferenças foram pontuais, contudo, a bebida com ácido cítrico apresentou pH desejável para uma bebida fermentada o que permite inibição de bactérias indesejáveis e maior quantidade proporcional inicial de FOS e menor variação com 30 e 60 dias de armazenamento. As bebidas também apresentaram quantidade consideráveis de compostos fenólicos como ácidos clorogênico e gálico que conferem importante atividade antioxidante que trazem vários benefícios a saúde.

5. REFERÊNCIAS

- Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, M.-A., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigné, C., Révész, C., 2002. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J. Nutr.* 132, 1962–1968.
- Akalın, A.S., Fenderya, S., Akbulut, N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *Int. J. food Sci. Technol.* 39, 613–621.
- Alves, A.M., Dias, T., Hassimotto, N.M.A., Naves, M.M.V., 2017. Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian savannah native fruits. *Food Sci. Technol.* 37, 564–569. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.26716>
- Angelo, P.M., Jorge, N., 2007. Phenolic compounds in foods-A brief review. *Rev. do Inst. Adolfo Lutz* 66, 1–9.
- Antosova, M., Polakovic, M., 2001. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chem. Pap.* 55, 350–358.
- ANVISA, 2002. Rdc No 02, De 07 De Janeiro De 2002. D.O.U. 2002.

- AOAC (Association of official analytical chemists) official methods of analysis. 2000. Univ. Michigan, Assoc. Off. Analytical Chem.
- AOAC (Association of official analytical chemists) official methods of analysis. 2005. Int. 18th ed, Gaithersburg, Maryland, USA 45, 75–76.
- Asquieri, E.R., da Silva Rabelo, A.M., de Moura e Silva, A.G., 2008. Fermented jackfruit: study on its physicochemical and sensorial characteristics. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 28, 881–887.
- Asquieri, E.R., Nishi, A.C.F., Batista, R.D., Asquieri, E.M. de A.R., 2020. Yacon extract drying (*Smallanthus sonchifolius*) by Spray Dryer: effect of the different carrier agents and evaluation of the levels of fructooligosaccharides and phenolic compounds. *Res. Soc. Dev.* 9, 591974521.
- Bloor, S.J., 2001. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 3–14.
- Borges, J.T. da S., Pirozi, M.R., Paula, C.D., Vidigal, J.G., Silva, N.A. de S., Caliman, F.R.B., 2012. Yacon na alimentação humana: aspectos nutricionais, funcionais, utilização e toxicidade. *Rev. Sci. Amaz.* 1, 3–16.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Brunetto, M. del R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G., Romero, C., 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chem.* 100, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.007>
- Caetano, B.F.R., de Moura, N.A., Almeida, A.P.S., Dias, M.C., Sivieri, K., Barbisan, L.F., 2016. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. *Nutrients* 8. <https://doi.org/10.3390/nu8070436>
- Caleja, C., Ribeiro, A., Filomena Barreiro, M., CFR Ferreira, I., 2017. Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. *Curr. Pharm.*

Des. 23, 2787–2806.

- Campos, D., Aguilar-Galvez, A., Pedreschi, R., 2016. Stability of fructooligosaccharides, sugars and colour of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots during blanching and drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51, 1177–1185.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Figueiredo, A.R., Tóth, I. V, Rangel, A.O.S.S., Hogg, T.A., 2009. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 144–151.
- Chaud, S.G., Sgarbieri, V.C., 2006. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 26, 369–379. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200020>
- Corazza, M.L., Rodrigues, D.G., Nozaki, J., 2001. Preparação e caracterização do vinho de laranja. *Quim. Nova* 24, 449–452.
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., Rivas, C.L., Requena, T., Rodríguez, J.M., Bartolomé, B., 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.* 161, 372–382.
- Curiel, J.A., Rodríguez, H., Landete, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2010. Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chem.* 120, 225–229.
- Carvalho, J., Orlanda, J.F.F., 2017. Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chem.* 233, 159–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.101>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* 33, 1–10.
- Ding, C.-K., Chachin, K., Ueda, Y., Imahori, Y., Wang, C.Y., 2001. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2883–2888.
- Dionisio, A.P., Wurlitzer, N.J., Garruti, D., 2016. Stability of a functional beverage composed by tropical fruits and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) under refrigerated storage. *Arch. Latinoam. Nutr.* 66, 148–155.

- Evangelista, S.R., Miguel, M.G. da C.P., Silva, C.F., Pinheiro, A.C.M., Schwan, R.F., 2015. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 210, 102–112.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C.M., Lafay, S., 2008. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J. Nutr.* 138, 2309–2315.
- Ferreres, F., Gomes, D., Valentão, P., Gonçalves, R., Pio, R., Chagas, E.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2009. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem.* 114, 1019–1027.
- Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Gänzle, M.G., 2015. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiol.* 46, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018>
- Fleming, H.P., McDonald, L.C., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Humphries, E.G., 1995. Fermentation of cucumbers without sodium chloride. *J. Food Sci.* 60, 312–315.
- García-Martínez, T., Puig-Pujol, A., Peinado, R.A., Moreno, J., Mauricio, J.C., 2012. Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 351–359.
- Genta, S.B., Cabrera, W.M., Grau, A., Sánchez, S.S., 2005. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1657–1665.
- Graefe, S., Hermann, M., Manrique, I., Golombek, S., Bürkert, A., 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *F. Crop. Res.* 86, 157–165.
- Gusso, A.P., Mattanna, P., Richards li, N., 2015. Yacon: benefícios à saúde e aplicações tecnológicas Yacon: health benefits and technological applications. *Ciência Rural* 4545, 912–919. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140963>
- Hu, K., Jin, G.J., Mei, W.C., Li, T., Tao, Y.S., 2018. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. *Food Chem.* 239, 495–501.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.151>

- Kim, B., Hong, V.M., Yang, J., Hyun, H., Im, J.J., 2016. Review Article A Review of Fermented Foods with Beneficial Effects on Brain and Cognitive Function 21, 297–309.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J., Greifová, M., 2006. Lactic acid fermentation of some vegetable juices. *J. Food Nutr. Res.* 45, 115–119.
- Korakli, M., Pavlovic, M., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2003. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2073–2079.
- Korakli, M., Vogel, R.F., 2006. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 790–803.
- Kotovicz, V., 2011. Otimização da desidratação osmótica e secagem do yacon (*Polymnia sonchifolia*).
- Krüger, R., Kempka, A.P., Oliveira, D. de, Valduga, E., Cansian, R.L., Treichel, H., Di luccio, M., 2008. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. *Aliment. e Nutr.* 19, 43–53.
- Lachman, J., Fernández, E.C., Orsák, M., 2003. Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poeppl . et Endl .) H . Robinson] chemical composition and use – a review 2003, 283–290.
- Lago, C.C., Noreña, C.P.Z., 2017. Thermodynamic and kinetics study of phenolics degradation and color of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) microparticles under accelerated storage conditions. *J. Food Sci. Technol.* 54, 4197–4204.
- Lewu, M.N., Adebola, P.O., Afolayan, A.J., 2010. Comparative assessment of the nutritional value of commercially available cocoyam and potato tubers in South Africa. *J. Food Qual.* 33, 461–476.
- Lopes, R. de V.V., Rocha, A.S., SILVA, F.L.H., GOUVEIA, J.P.G., 2005. Aplicação do planejamento fatorial para otimização do estudo da produção de fermentado do fruto da palma forrageira. *Rev. Bras. Prod. Agroindustriais. Campinas* 7, 25–32.
- Lutz, A., 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para Anal. Aliment. 260.

- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., 2006. Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24, 701–714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03042.x>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P. V, Clark, D.P., 2010. *Microbiologia de Brock*. 12a. Ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, RS 1160.
- Malang, S.K., Maina, N.H., Schwab, C., Tenkanen, M., Lacroix, C., 2015. Characterization of exopolysaccharide and rropy capsular polysaccharide formation by *Weissella*. *Food Microbiol.* 46, 418–427.
- Malik, A., Radji, M., Kralj, S., Dijkhuizen, L., 2009. Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. *FEMS Microbiol. Lett.* 300, 131–138.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Marcon, L.D.N., de Sousa Moraes, L.F., dos Santos Cruz, B.C., de Oliveira Teixeira, M.D., Bruno, T.C.V., Ribeiro, I.E., Messias, A.C., Ferreira, C.L. de L.F., de Oliveira, L.L., Peluzio, M. do C.G., 2019. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-based product increases fecal short-chain fatty acids and enhances regulatory T cells by downregulating ROR γ t in the colon of BALB/c mice. *J. Funct. Foods* 55, 333–342.
- Maruyama, L.Y., Cardarelli, H.R., Buriti, F.C.A., Saad, S.M.I., 2006. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: Influência de diferentes combinações de gomas. *Cienc. e Technol. Aliment.* 26, 386–393. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200022>
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12, 173–182.
- Matusek, A., Merész, P., Le, T.K.D., Örsi, F., 2009. Effect of temperature and pH on the degradation of fructo-oligosaccharides. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 355–365.
- Mizobutsi, G.P., Finger, F.L., Ribeiro, R.A., Puschmann, R., Neves, L.L. de M., da Mota, W.F., 2010. Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. *Sci. Agric.* 67, 213–217.

<https://doi.org/10.1590/s0103-90162010000200013>

- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., Remaud-Siméon, M., 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 675–685.
- Moreno, J., Peinado, R., 2012. *Enological chemistry*. Academic Press.
- Muniz, C.R., Borges, M. de F., DE ABREU, F.A.P., Nassu, R.T., DE FREITAS, C.A.S., 2002. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. *Bol. do Cent. Pesqui. Process. Aliment.* 20.
- Ojansivu, I., Lucia, C., 2011. Yacon , a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.005>
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131, 66–71.
- Paula, B. De, Duarte, C., Filho, C., Pinto, C.O., 2012. Produção e caracterização físico-química de fermentado de umbu 1688–1693.
- Pedreschi, R., Campos, D., Naratto, G., Chirinos, R., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp . Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics 5278–5284.
- Pereira, D.I.A., Gibson, G.R., 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 259–281. <https://doi.org/10.1080/10409230290771519>
- Pereira, J.A.R., Teixeira, M.C., Saczk, A.A., Barcelos, M. de F.P., Oliveira, M.F. de, Abreu, W.C. de, 2016. Total antioxidant activity of yacon tubers cultivated in Brazil. *Ciência e Agrotecnologia* 40, 596–605.
- Queiroz, C., da Silva, A.J.R., Lopes, M.L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2011. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chem.* 125, 128–132.
- Rechner, A.R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G.P., Moore, K.P., Rice-Evans, C.A., 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 220–235.
- Reina, L.D., Pérez-Díaz, I.M., Breidt, F., Azcarate-Peril, M.A., Medina, E., Butz, N., 2015. Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous

- fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.007>
- Ricarte, D., De Almeida Júlio, B.L., Folly Zocateli, G.A., Ferreira Barreto, R.L., Guimarães, M., De Souza Ferreira, R., Sernizon Guimarães, N., 2020. Análise sensorial de preparações com batata yacon: revisão sistemática. *HU Rev.* 45, 431–440. <https://doi.org/10.34019/1982-8047.2019.v45.28419>
- Rizzon, L.A., Bernardi, J., Miele, A., 2005. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. *Food Sci. Technol.* 25, 750–756.
- Rocha, W.S., Lopes, R.M., Silva, D.B. da, Vieira, R.F., Silva, J.P. da, Agostini-Costa, T. da S., 2011. Total phenolics and condensed tannins in native fruits from brazilian savanna. *Rev. Bras. Frutic.* 33, 1215–1221.
- Rodrigues, A.M., Sant’anna, E. s., 2001. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida 1 21, 57–62.
- Rodrigues, O.R.L., Asquieri, E.R., Orsi, D.C., 2014. Prevention of enzymatic browning of yacon flour by the combined use of anti-browning agents and the study of its chemical composition. *Food Sci. Technol.* 34, 275–280.
- Rodríguez, H., Antonio, J., María, J., De, B., López, F., Felipe, D., Gómez-cordovés, C., Miguel, J., Muñoz, R., 2009. International Journal of Food Microbiology Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>
- Rosa, J.S. da, Godoy, R.L. de O., Oiano Neto, J., Campos, R. da S., Matta, V.M. da, Freire, C.A., Silva, A.S. da, Souza, R.S. de, 2007. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. *Food Sci. Technol.* 27, 837–846.
- Russo, D., Valentão, P., Andrade, P.B., Fernandez, E.C., Milella, L., 2015. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and anticholinesterase activities of *Smallanthus sonchifolius* landraces and correlation with their phytochemical profiles. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 17696–17718.
- Saha, B.C., Racine, F.M., 2011. Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 879–891.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2979-3>

- Santana, I., Cardoso, M.H., 2008. Raiz tuberosa de yacon (*S mallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo , aspectos tecnológicos e nutricionais.
- Sekwati-Monang, B., Gänzle, M.G., 2011. Microbiological and chemical characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. *Int. J. Food Microbiol.* 150, 115–121.
- Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J., Bru-Martínez, R., 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica Lindl.*): Kinetic characterization and comparison with the active form. *Arch. Biochem. Biophys.* 446, 175–185.
- Silva, N., 2007. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Varela.
- Silva, M.L.C., Costa, R.S., dos Santos Santana, A., Koblitz, M.G.B., 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semin. Ciências Agrárias* 31, 669–681.
- Silva, C.F., Vilela, D.M., de Souza Cordeiro, C., Duarte, W.F., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2013. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 235–247.
- Silva, M.D.F., Dionísio, A.P., Carioca, A.A.F., Adriano, L.S., Pinto, C.O., Abreu, F.A.P., Wurlitzer, N.J., Araújo, I.M., Garruti, D. dos S., Pontes, D.F., 2017. Yacon syrup: Food applications and impact on satiety in healthy volunteers. *Food Res. Int.* 100, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.035>
- Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K., Ulrichová, J., 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *J. Chromatogr. A* 1016, 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01183-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01183-X)
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D.L., Schieber, A., Ganzle, M.G., 2010. Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *J. Agric. Food Chem.* 58, 9214–9220.
- Taamalli, A., Contreras, M.D.M., Abu-Reidah, I.M., Trabelsi, N., Ben Youssef, N., 2019. Quality of phenolic compounds: Occurrence, health benefits, and applications in food industry. *J. Food Qual.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9594646>

- Takenaka, M., Yan, X., ONO, H., Yoshida, M., Nagata, T., Nakanishi, T., 2003. Caffeic Acid Derivatives in the Roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) 793–796.
- Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2003. In situ production of EPS by intestinal and cereal isolates of lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 945–952.
- Topolska, K., Filipiak-Florkiewicz, A., Florkiewicz, A., Cieslik, E., 2017. Fructan stability in strawberry sorbets in dependence on their source and the period of storage. *Eur. food Res. Technol.* 243, 701–709.
- Valentová, Kateřina, Ulrichová, J., 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii*-prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. *Biomed. Pap.* 147, 119–130.
- Van Hijum, S., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Van Der Maarel, M., Dijkhuizen, L., 2002. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4390–4398.
- Van Hijum, S.A.F.T., Bonting, K., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L., 2001. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 323–328.
- Vanini, M., Barbieri, R.L., Ceolin, T., Heck, R.M., Mesquita, M.K., 2009. A relação do tubérculo andino yacon com a saúde humana. *Ciência, Cuid. e Saúde* 8, 92–96.
- Vasconcelos, C.M., de Oliveira, E.B., Rossi, S.N., Arantes, L.F., Puschmann, R., Chaves, J.B.P., 2015. Evaluating strategies to control enzymatic browning of minimally processed yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food bioprocess Technol.* 8, 1982–1994.
- Vega, R., Zuniga-Hansen, M.E., 2015. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. *Food Chem.* 173, 784–789.
- Vilhena, S.M.C., Câmara, F.L.A., Kakihara, S.T., 2000. O cultivo de yacon no Brasil. *Hortic. Bras.* 18, 5–8. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362000000100002>
- Watt, B.K., Merrill, A.L., 1964. *Composition of foods: raw, processed, prepared.*

Consumer and Food Economics Research Division, Agricultural Research Service

- Yan, M.R., Welch, R., Rush, E.C., Xiang, X., Wang, X., 2019. A sustainable wholesome foodstuff; health effects and potential dietotherapy applications of yacon. *Nutrients* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu11112632>
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria 97, 1427–1430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.018>
- Zardo, D.M., Alberti, A., Dantas, A.P.C., Guyot, S., Wosiacki, G., Nogueira, A., 2008. Effect of the processing in the phenolic compounds content and antioxidant activity in apple wine. *Semin. Ciências Agrárias* 29, 829–838.

CAPÍTULO 2

BEBIDA DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*) FERMENTADA ESPONTANEAMENTE: CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE EM *CAENORHABDITIS ELEGANS*

RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tem sido considerado alimento com alegação funcional, sendo uma fonte abundante de frutooligossacarídeo (FOS), com propriedades prebióticas, associado a benefícios à saúde. No entanto, essa raiz é muito perecível e, portanto, técnicas que favoreçam sua vida de prateleira e, ainda, preservem seus constituintes benéficos são visadas. Assim, este trabalho teve como objetivo produzir bebidas de yacon fermentadas espontaneamente, caracterizá-las e analisá-las toxicologicamente em modelo *in vivo* de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Foram analisadas as bebidas fermentadas de yacon contendo ácido cítrico, cisteína ou sem agente antiescurecimento (controle) após 30 dias de armazenamento, quanto às características microbiológicas, nutricional, físico-química, de compostos fenólicos, atividade antioxidante e toxicidade aguda. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA e teste Duncan para comparação das médias, ambos a 5% de probabilidade. Observou-se que, independente da presença ou não dos agentes anti-escurecimento, as contagens microbiológicas atingiram quantidades de 10^{8-9} UFC/ml e pH, acidez total titulável, sólidos solúveis e densidade não variam estatisticamente ($p > 0,05$) entre as bebidas fermentadas. Mas a bebida adicionada de ácido cítrico apresentou maior preservação de FOS, compostos fenólicos a atividade antioxidante superior. Ainda, o ensaio de toxicidade mostrou que as bebidas analisadas não provocaram mortalidade ou prejudicaram o desenvolvimento do *C. elegans*, tendo a bebida com ácido cítrico apresentado maior desenvolvimento dos vermes. Desta forma, os resultados demonstram pela primeira vez que as bebidas fermentadas de yacon avaliadas após 30 dias de armazenamento não apresentaram toxicidade aguda, indicando que as mesmas podem ser seguras para o consumo humano. Somado a isso, pode-se sugerir um efeito simbiótico da bebida que naturalmente possui FOS, considerados prebióticos e que podem ter favorecido na bebida, a proliferação

de microrganismos benéficos à saúde, os probióticos, especialmente da bebida fermentada de yacon contendo ácido cítrico como agente antiescurecimento.

Palavras-chaves: Yacon; Bebida fermentada; *Caenorhabditis elegans*; Toxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa, semelhantes às batatas doces em aparência, de gosto doce e polpa crocante, sendo bastante consumidas na forma *in natura*. Essa raiz é oriunda da região Andina, e tem sido considerada alimento com alegação funcional em decorrência de seus componentes, tais como as fibras alimentares solúveis, que devido a sua baixa digestibilidade pelas enzimas do trato gastrointestinal humano estimula o crescimento seletivo e atividade de bactérias intestinais promotoras da saúde, conferindo ao alimento propriedade prebiótica (Guigoz et al., 2002; Pereira, Gibson, 2002; Sacramento et al., 2017). Sua composição tem como principais substâncias água e carboidratos, os quais são armazenados principalmente sob a forma de frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, que conferem naturalmente características funcionais (Valentová, Ulrichová, 2003; Rivera, Manrique, 2005) Aliado à presença das fibras prebióticas, o yacon também apresenta compostos fenólicos com importante atividade antioxidante (Simonovska et al., 2003).

O reconhecimento dos efeitos promissórios para à saúde advindo do consumo de yacon como prevenção e redução de risco de aterosclerose, redução da absorção de glicose, redução do risco de câncer de cólon (Vanini et al., 2009; Delgado et al., 2013; Oliveira et al., 2013), melhora do sistema imune (Vaz-Tostes et al., 2014) e outros, aumentou o interesse comercial nos mercados, levando ao desenvolvimento de atividades comerciais em torno de seu cultivo (Manrique, 2005).

Apesar da forma mais comum de consumir yacon ser a *in natura*, muitos produtos como xarope, farinha, suco, chips (yacon cortado em lâminas desidratado) e chá (das folhas) foram desenvolvidos a fim de aproveitar as potencialidades desse alimento (Adriano et al., 2019; Ross, 2019; Torres, 2019;

Ueda et al., 2019; Machado et al., 2020; Marques et al., 2020), contudo, as pesquisas relacionadas ao processo de fermentação do yacon ainda são muito recentes, principalmente se considerarmos a fermentação de forma espontânea da raiz.

A fermentação é um processo gerado pelas transformações químicas da matéria orgânica catalisadas por enzimas produzidas por microrganismos. A transformação da matéria ocorre pela oxidação e quebra de carboidratos liberando energia e produzindo aceptores para se ligarem (Jay et al., 2008).

A fermentação do alimento depende do tipo de microrganismo e da carga microbiana inicial, teor de água livre e composição do alimento. Os microrganismos normalmente encontrados na fermentação vegetal são as bactérias do ácido láctico (BAL) que adquirem energia através da fosforilação durante a oxidação dos carboidratos, atuando na produção de ácidos e gases para sua metabolização e mutiplicação (Jay et al., 2008; Rodríguez et al., 2009a). A fermentação também é dependente de fatores como temperatura, pH inicial e teor de NaCl presente, normalmente entre 2 a 10% (Rodríguez et al., 2009b; Reina et al., 2015). O NaCl estimula a produção das BaL, regulando a osmolaridade e ainda impede a proliferação de bactérias competidoras (Carbonera, Espírito Santo, 2010).

No entanto, além do desenvolvimento de uma bebida fermentada de características e propriedades nutricionais e físico-químicas adequadas, é de suma importância verificar a segurança do produto, quanto à ausência de toxicidade, para posteriores testes e comercialização. Uma forma de verificar essa segurança ocorre por testes toxicológicos *in vivo* utilizando *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), um nematódeo facilmente cultivado em laboratório, devido ao seu tamanho reduzido, ciclo de vida curto e baixo custo de manutenção (Brenner, 1974). A análise da toxicidade *in vivo* utilizando o *C. elegans* apresenta vantagens em relação às análises *in vitro*, como por exemplo à cultura de células, pois trata-se de um organismo multicelular, capaz de permitir que a ação dos compostos estudados seja avaliada de forma sistêmica (Mohan et al., 2010). Além disso, o cultivo e os experimentos realizados com este organismo são muito mais baratos, quando comparados com testes em camundongos ou outros modelos mamíferos. Isto se deve principalmente ao fato de que, no caso do *C. elegans*, a oferta de animais não é limitante, uma vez que eles crescem

rapidamente em um sistema simples e barato, onde podem ser gerados milhares de corpos em poucos dias (Mohan et al., 2010; Hunt, 2017). Estas vantagens permitiram o desenvolvimento de estratégias de alta demanda, rápida e prática para identificação de compostos que causam alterações no *C. elegans* (Leung et al., 2008; Fitzgerald et al., 2009).

Desta forma, diante da possibilidade de uma bebida de yacon espontaneamente fermentada com efeitos benéficos à saúde devido à presença de prebióticos, compostos antioxidantes e, possivelmente, probióticos, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar microbiológica, nutricional, bioativa e físico-quimicamente a bebida de yacon espontaneamente fermentada e avaliar a sua toxicidade aguda in vivo em *C.elegans*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3 agentes antiescurecimento (cisteína, ácido cítrico e controle) e 3 repetições, totalizando 9 unidades experimentais.

As concentrações adicionadas às bebidas de yacon do ácido cítrico e cisteína foram de 0,05% (m/v) definidos conforme testes preliminares e o trabalho de Vasconcelos et al (2015).

2.2 Preparo das bebidas de yacon

As raízes foram obtidas no comércio local da cidade de Vila Velha/ES. As etapas de preparo foram baseadas na metodologia descrita por Vasconcelos et al. (2015) com algumas adaptações.

Primeiramente as raízes foram selecionadas para retirada daquelas impróprias para consumo, higienizadas em água corrente e descascadas manualmente. Depois foram cortadas em fatias cilíndricas de aproximadamente 2 cm e submetidas ao branqueamento à 100 °C por 4 minutos com a quantidade de agente antiescurecimento calculada para o peso de yacon.

As fatias foram imediatamente removidas do branqueamento, sendo a água desprezada, e colocadas em um recipiente contendo água e gelo na proporção 1:1 (m/v) yacon: água e gelo. Depois, desprezou-se novamente a

água e o yacon foi triturado com 2% de NaCl, conforme utilizado por Reina et al. (2015) em mix (Walita Philips, Brasil). As bebidas foram então embaladas em embalagens plásticas impermeáveis, utilizando seladora à vácuo Orved e Brock (Mod.-12) para evitar trocas gasosas, e mantidas sob refrigeração, aproximadamente 10 °C por 30 dias, definido conforme testes anteriores (Capítulo 1). Após esse período foram realizadas as análises.

A bebida controle foi preparada seguindo todas as etapas anteriores, com exclusiva exceção da adição de agente antiescurecimento durante o branqueamento.

2.3 Contagem microbiológica

Nas análises microbiológicas foram utilizados os meios de cultura seletivos: *Plate Count Agar* (PCA) Biolog® para bactérias totais, MRS *Lactobacillus Kasvi*® para lactobacilos e Ágar Sabouraud Dextrose Kasvi® para levedura e fungos filamentosos. Os meios foram preparados segundo a orientação do fabricante e as análises realizadas conforme técnica descrita por Silva (2007), que consiste na diluição das bebidas em série, em solução salina e plaqueados. As contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por grama da Amostra (UFC.g⁻¹).

2.4 Determinação da composição centesimal

A composição centesimal foi avaliada segundo metodologias oficiais da AOAC (2005): Umidade, determinada por secagem em estufa a 105 °C até peso constante; proteína, pelo método de Kjeldahl empregando-se 5,75 como fator de conversão de nitrogênio em proteína; cinzas, por incineração em mufla a 550 °C e lipídeos totais pelo método de extração de Goldfish.

Calculou-se o teor de carboidratos totais por diferença, subtraindo-se de 100 a soma dos valores dos demais constituintes da composição centesimal (umidade, proteína, lipídios e cinzas) (AOAC, 2005). O valor calórico da bebida de yacon em estudo foi calculado a partir dos fatores de conversão de Atwater: 4 kcal.g⁻¹ para proteínas e carboidratos e 9 kcal.g⁻¹ para lipídios (Watt, Merrill, 1964).

2.5 Quantificação de carboidratos simples

Sacarose, frutose, glicose e manitol das bebidas fermentadas de yacon foram determinados por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) segundo Silva et al. (2013) e Evangelista et al. (2015), com algumas adaptações.

Eppendorfs com 2 ml de cada amostra foram colocados na centrífuga (Heraeus Megafuge 16R®) a 10.000 rpm por 10 minutos a 10 °C. O sobrenadante passou por microfiltração em filtro de acetato de celulose de 0,2 µm para remoção da fração insolúvel. A separação dos açúcares foi realizada por uma coluna (Aminez HPX-87C de 250 cm x 4 mm) a 55 °C. Foi utilizada uma fase móvel constituída de 266 µl de ácido sulfúrico por litro de água ultrapura, a um coeficiente de vazão de 0,8 ml.minuto⁻¹. Vinte microlitros de amostra foram injetados e corridos durante 35 min.

Pelo detector de índice de refração (RID) os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção de padrões (manitol, frutose, glicose e sacarose – Sigma Aldrich®) previamente injetados e quantificados pela área dos picos observados nos cromatogramas. Os resultados foram expressos como a porcentagem da área do pico.

2.6 Análises físico-químicas

A determinação do pH foi realizado de acordo com o método da AOAC (2000), utilizando um pHmetro digital (marca Quismis-Q400).

Os sólidos solúveis totais (SST) e densidade foram determinados com auxílio de um refratômetro digital, segundo o método AOAC (1997) pelo refratômetro modelo RTP 20 ATC. Estes resultados são expressos em °Brix e g.cm⁻³, respectivamente.

A acidez total titulável foi determinada por meio da titulação da bebida com solução de hidróxido de sódio 0,01M até obtenção de coloração rósea, seguindo o método nº 942.15 da AOAC (1997).

A turbidez foi determinada utilizando o espectrofotômetro KASUAKI para medir a absorvância das amostras a um comprimento de onda de 595 nm, onde utilizou-se água destilada como branco para comparar (AOAC, 1995).

2.7 Determinação de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método utilizado por Bloor (2001), com algumas modificações. A extração foi realizada pesando 1 g de amostra em tubo falcon com proteção da luz, adicionando 10 ml de metanol (MeOH): água (60:40 v/v) e em seguida, centrifugado a 3500 rpm por 10 min (marca Fanem®, modelo Excelsa i 2206). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o volume, diluído até 15 ml. Em uma placa de 96 poços foi adicionado uma alíquota de 100 µl da amostra, 100 µl do reagente Folin Ciocalteu (Sigma®), a uma concentração de 20% e, em seguida, de 100 µl de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5%. Após 30 min foi realizada a leitura a 765 nm em espectrofotômetro SpectraMax®190.

Uma curva analítica de ácido gálico Dinâmica Ltda ®, nas concentrações de 10 a 100% foi elaborada, gerando a equação de regressão ($y = 0,2528 + 0,0698x$, $R^2 = 0,9990$) foi realizado o cálculo do teor de compostos fenólicos totais, sendo os resultados expressos em mg EAG por grama de bebida.

2.8 Determinação da atividade antioxidante

A análise da atividade antioxidante foi realizada utilizando os radicais ABTS, DPPH e FRAP.

2.8.1 ABTS

Foram pipetados trinta microlitros de cada bebida e adicionados de 270 µl do radical ABTS em uma microplaca. Após 6 minutos, a absorbância foi lida a 734 nm em espectrofotômetro SpectraMax® 190. A análise do branco foi realizada com metanol concentrado NEON® (Awika, Rooney, Wu, Prior, & Cisneros-Zevallos, 2003). Uma curva analítica de ácido gálico foi preparada a partir das concentrações de 0,00002 a 0,00250 µg, gerando a equação de regressão ($y = -364,62x + 0,7521$; $R^2 = 0,9854$). Os resultados foram expressos por meio do índice de atividade de eliminação de radical (I), utilizando a equação: $I (\%) = [(Abs\ branco - Abs\ amostra) \times 100] / Abs\ Branco$ (Dionisio et al., 2016; Scherer and Godoy, 2009a).

2.8.2 DPPH

DPPH foi determinado pelo método utilizado por Scherer e Godoy (2009),

com algumas modificações. Foram pipetados em microplaca vinte microlitros de cada bebida e 280 µl do radical DPPH. A leitura foi realizada a 517 nm após 60 minutos de incubação, ao abrigo da luz em espectrofotômetro SpectraMax® 190. A análise do branco foi realizada com metanol concentrado NEON® (Bloor, 2001). Foi elaborada uma curva analítica de ácido gálico, nas concentrações de 0,00002 a 0,00250 µg, por meio da equação de regressão ($y = -348,34x + 0,7911$; $R^2 = 0,9811$). Os resultados foram expressos por meio do índice de atividade de eliminação de radical (I), por meio da equação: $I (\%) = [(Abs\ branco - Abs\ amostra) \times 100] / Abs\ Branco$ (Scherer and Godoy, 2009a).

2.8.3 FRAP

Foram pipetados em microplaca trinta microlitros de cada bebida e adicionados de 270 µl de solução FRAP. A leitura foi realizada a 595 nm após 10 minutos de incubação, ao abrigo da luz, em espectrofotômetro SpectraMax® 190. A análise do branco foi realizada com metanol concentrado NEON®. O resultado foi expresso por meio do índice de atividade de eliminação de radical (I), calculado pela equação: $I (\%) = [(Abs\ branco - Abs\ amostra) \times 100] / Abs\ Branco$ (Benzie and Strain, 1996; Scherer and Godoy, 2009a).

2.9 Análise de toxicidade aguda em *C.elegans*

2.9.1 Preparo da cepa de *C. Elegans* para sincronização

Utilizou-se no estudo cepas dos nematódeos *C. elegans* N2, do tipo selvagem, cedidas gentilmente pela Professora Solange Cristina Garcia, responsável pelo Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, obtidos a partir do “Caenorhabditis Genetics Center” (USA).

Foram preparadas 3 placas de petri contendo meio de crescimento para nematoides (NGM) (Brenner, 1974) Foram acrescentados ao meio 30 microlitros de solução contendo *Escherichia Coli* geneticamente modificadas do tipo Na22. Replicou-se a cepa de *C. elegans* tipo selvagem (N2 - sem modificação genética) utilizando pedaços do meio de cultura para a manutenção contendo os nematódeos em todos os estágios larvais, que eram mantidos em meio de

crescimento para nematódeos (NGM- *Nematode Growth Medium*) com Ágar e *Escherichia coli* OP50 a 20 °C. As placas contendo a repicagem foram levadas a estufa TE- 391 BOD mantidas a temperatura de 20 °C por 3 dias para incubação (Brenner, 1994; Porta-de-la-Riva et al., 2012).

Após 3 dias verificou-se ao microscópio (Leica, DMLS, Alemanha) a obtenção de altas quantidades de nematódeos grávidos. Lavou-se as placas com água autoclavada utilizando pipeta Pasteur, colocou o conteúdo em falcons de 15 ml até completar seu volume, centrifugou por 6 minutos a 3600 rpm na centrífuga Excelsa® i 2206 e retirou o sobrenadante de cada falcon, até restar 2 ml de sedimento. Essa etapa foi realizada mais uma vez, desmanchando o pellet formado no fundo dos falcons.

Preparou-se a solução *bleaching* feita com adição de 6 ml NaOH 10 M, 20 ml de hipoclorito e o restante com água autoclavada até completar o balão volumétrico de 100 ml. Foram adicionados 4,5 ml dessa solução nos falcons que continham os nematódeos grávidos. Agitou-os vigorosamente durante 6 minutos até romper as cutículas liberando os ovos e retirou até 3 ml da espuma formada. Acrescentou nos tubos falcon a solução tampão M9 (3 g KH₂PO₄ + 6 g Na₂HPO₄ + 5 g NaCl + 1 L H₂O com adição posterior de MgSO₄ 1M) até completar, desmanchando o pellet formado. Foram submetidos a centrifugação novamente a 3600 rpm por 6 minutos, com posterior retirada do sobrenadante e adição do tampão M9. Esse procedimento de centrifugação e remoção de sobrenadante foi realizado até restar aproximadamente 1,5 ml. O conteúdo dos falcons contendo os ovos foram transferidos para placas de petri (90x15 mm) e incubados por aproximadamente 16 horas (Porta-de-la-Riva et al., 2012).

2.9.2 Tratamento da cepa de *C. Elegans*

Uma gota da solução (3 µl) contendo os vermes sincronizados L1 foram analisadas em microscópio (Leica, DMLS, Alemanha®), para calcular o volume necessário de solução para atingir aproximadamente 2500 vermes.

Os vermes sincronizados foram adicionados em eppendorfs junto com a solução M9 e 50 µl de cada bebida fermentada de yacon. Posteriormente foram expostos por 30 minutos (tratamento agudo) a 20 °C, por agitação constante em um homogeneizador em meio líquido 0,5% NaCl.

Após a exposição, os vermes foram lavados 3 vezes com NaCl a 0,5%

para remover as bebidas e, em seguida, transferidas e espalhadas para placas NGM inoculadas com *E. coli* OP50. Logo após, foram mantidas à 20 °C até secarem e depois tampadas, sendo colocadas na incubadora BOD por 24 horas (Avila et al., 2012; Charão et al., 2015; Augusti et al., 2017).

2.9.3 Avaliação da mortalidade e desenvolvimento dos *C. Elegans*

Após a incubação de 24 horas, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes em cada placa por meio de microscópio (Leica, DMLS, Alemanha®), avaliando o percentual de morte causado pelas bebidas. A placa contendo os nematódeos foi colocada sobre uma lâmina de retroprojeter com 64 quadrantes igualmente divididos e adicionados abaixo das placas. Contou-se 6 quadrantes de cada duplicata e calculou-se a média (Charão et al., 2015). Feita a contagem, as placas retornaram à incubadora para completar 48 horas do período de incubação.

O desenvolvimento dos *C.elegans* foi então avaliado por meio da medida de área corporal (μ^2) dos vermes adultos em estereomicroscópio (Olympus IX71). As placas contendo os vermes foram lavadas com água autoclavada e estes transferidos para tubos de centrifugação. O processo foi repetido até que a solução estivesse límpida. Em seguida, 15 μ l da solução com vermes foi depositados sobre uma lâmina coberta por agarose e quando necessário adicionou 30 μ l de levamisol 2,25%. Os vermes foram fotografados para terem seu contorno corporal medido (10 medições) manualmente com auxílio do software AxioVision versão 4.8.2 (Charão et al., 2015; Augusti et al., 2017).

2.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA), a 5% de probabilidade. Para resultados significativos ($p \leq 0,05$) em relação aos agentes antiescurecimento, as médias foram comparadas pelo teste Duncan na mesma probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SAS, versão online.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem microbiológica

A análise dos resultados indicou que não houve variação significativa ($p > 0,05$) entre as bebidas de yacon fermentadas com cisteína, ácido cítrico ou sem agente antiescurecimento. Nas 3 bebidas a quantidade de microrganismos totais, bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos filamentosos, tiveram um comportamento semelhante como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios do crescimento de microrganismos (UFC.g⁻¹) das bebidas de yacon fermentada espontaneamente, nos diferentes meios de cultura avaliados.

Análises	Controle	Cisteína	Ácido cítrico
Bactérias totais	3,3 x 10 ^{8a}	1,1 x 10 ^{9a}	7,3 x 10 ^{8a}
Bactéria ácido láctica	4,3 x 10 ^{8a}	1,1 x 10 ^{9a}	1,0 x 10 ^{9a}
Leveduras e fungos filamentosos	7,2 x 10 ^{8a}	1,0 x 10 ^{9a}	1,4 x 10 ^{9a}

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Duncan.

A bebida de yacon após 30 dias de fermentação espontânea teve o predomínio de leveduras e bactérias ácido lácticas (BAL), atingindo uma população de 10⁸⁻⁹ UFC.g⁻¹. A adição de NaCl durante o processamento da bebida, favorece o crescimento de bactérias ácido lácticas, que pela sua atividade metabólica produz ácido láctico reduzindo o pH do meio, inibindo a proliferação de bactérias competitivas (Reina et al., 2009; Rodríguez et al., 2009a).

Os resultados encontrados concordam com os dois estudos de Reina que avaliaram yacon fermentado espontaneamente utilizando 2% de NaCl e observaram predomínio de bactérias ácido lácticas (10⁹ UFC.g⁻¹) com 30 dias de fermentação, e identificaram três tipos de *Leuconostoc spp.*, sendo elas *mesenteroides*, *pseudomesenteroides* e *citreum*.

As pesquisas relacionadas ao processo de fermentação do yacon ainda são muito recentes, sendo a maioria delas realizadas por fermentação exógena, ou seja, com adição de culturas probióticas, como demonstrado nos estudos de Chen et al. (2019) e Dahal et al. (2020). A adição de culturas permite o predomínio do microrganismo inoculado, diferentemente da fermentação endógena, a qual

permite o crescimento de microrganismos diversos que irão proliferar em simbiose.

Segundo ANVISA (2002) e Krüger et al. (2008), a quantidade mínima viável para microrganismos probióticos garantirem efeitos funcionais deve ser de 10^8 UFC.g⁻¹. Corroborando com nossas análises, os resultados demonstraram valores acima do recomendado nos três meios de cultura após 30 dias de armazenamento, sugerindo a possibilidade de uma bebida capaz de oferecer benefícios à saúde.

3.2 Caracterização nutricional

Os resultados da composição centesimal das bebidas de yacon fermentadas espontaneamente estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Média e desvio padrão da composição centesimal (g.100 g⁻¹) e valor calórico total (VCT – kcal.100 g⁻¹) das bebidas de yacon com e sem agentes antiescurecimento.

Constituintes	Controle	Cisteína	Ácido cítrico
Umidade	89,20 ± 0,85 ^b	90,27 ± 0,49 ^a	91,27 ± 0,70 ^a
Carboidratos	6,91 ± 1,47 ^a	5,81 ± 1,00 ^b	5,09 ± 0,26 ^b
Proteínas	0,15 ± 0,05 ^a	0,21 ± 0,08 ^a	0,16 ± 0,03 ^a
Lipídeos	1,53 ± 0,42 ^a	1,52 ± 0,14 ^a	1,36 ± 0,37 ^a
Cinzas	2,18 ± 0,19 ^a	2,18 ± 0,10 ^a	2,11 ± 0,14 ^a
VCT	42,13 ± 2,17 ^a	37,83 ± 1,06 ^b	33,25 ± 3,65 ^b

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Duncan.

A quantidade de proteína, lipídios e cinzas não apresentou variação significativa ($p > 0,05$). O teor de cinzas está relacionado à presença de minerais e vai depender das condições climáticas e local de cultivo. Assim, a caracterização físico-química da raiz de yacon pode apresentar diferenças entre os valores encontrados por diferentes autores.

Umidade, carboidratos e VCT variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre as bebidas, provavelmente pelas variações do teor de água da raiz, mas também, pelo processo de fermentação. Não obstante, os resultados condizem com a literatura, que demonstram a elevada atividade de água presente na raiz

de yacon, com variação de 70 a 90% do peso fresco e de 10 a 14% de matéria seca, especialmente carboidratos (Vasconcelos et al., 2010; Marcon et al., 2019), como apontado por Ribeiro (2008) e Vilhena (2000) ao analisarem a composição química da polpa de yacon e encontrar 87,52% e 85,93% de umidade, respectivamente. Azevedo (2018) obteve 88,86% de umidade também na porção comestível da raiz e Vasconcelos et al. (2010), 91,10% de umidade. Esse elevado teor de umidade torna a raiz de yacon bastante susceptível à deterioração e, conseqüentemente, redução da sua vida útil.

Além da água, outro constituinte predominante na raiz de yacon são os carboidratos (Kotovicz, 2011; Cao et al., 2018), dentre eles, são encontrados os monossacarídeos frutose e glicose, dissacarídeo sacarose e os oligossacarídeos frutooligosacarídeos (FOS), além de quantidades menores de inulina, sendo os dois últimos considerados fibras solúveis. Todos esses carboidratos podem ser utilizados como substrato no processo de fermentação pelos microrganismos que, por sua vez, sintetizam outros compostos como ácido láctico (Reina et al., 2015).

Como consequência do elevado teor de umidade e presença de fibras, o yacon é considerado um alimento com baixo valor energético (Lewu et al., 2010).

A quantidade de carboidratos foi analisada, no entanto, não foram identificadas, pela metodologia utilizada, presença de glicose, frutose, sacarose e manitol. Os resultados das áreas cromatográficas obtidas foram comparados com a área total de cada bebida e apresentados na forma de porcentagens (Tabela 3).

Tabela 3. Valores percentuais de FOS em relação à área das curvas cromatográficas geradas na determinação de carboidratos das bebidas de yacon fermentadas espontaneamente com e sem agentes antiescurecimento.

Bebida	Controle	Cisteína	Ácido cítrico
FOS	55,32 ± 4,17 ^b	57,00 ± 4,71 ^b	77,29 ± 6,84 ^a
Área*	0,87	1,00	0,90

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Duncan.

*Proporção entre as áreas cromatográficas obtidas para cada bebida.

Observa-se elevada proporção de FOS em todas as bebidas, sendo

relacionado ao teor à área cromatográfica obtida, o que é esperado uma vez que o yacon é o alimento com maior conteúdo desse constituinte (Santana, Cardoso, 2008b; Fujishima et al., 2009; Apolinário et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015; Cao et al., 2018). Os FOS não são hidrolisados pelas enzimas digestivas humanas, portanto são considerados fibra alimentar, pois, passa pelo trato gastrointestinal sem alterações significativas em sua estrutura, desenvolvendo função de prebiótico (Chandrashekar et al., 2011; Vogt et al., 2013). Assim, os FOS são de grande interesse como aditivo funcional para alimentos devido a suas propriedades prebióticas que favorece o crescimento de bactérias promotoras de saúde como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., reduzindo as populações patogênicas e promovendo a imunomodulação intestinal (Whelan, 2013; Caetano et al., 2016), compondo assim uma boa oportunidade de agregar valor ao produto em termos de funcionalidade (Delgado et al., 2010).

Apesar da literatura relatar maior teor de FOS, quase 10% da matéria seca, as bebidas foram analisadas após 30 dias de armazenamento, o que gerou uma fermentação endógena com redução do pH, crescimento de microrganismos e, conseqüentemente, redução das cadeias de FOS. Essas cadeias são instáveis em determinadas condições de processo, inclusive pH e, associado a isso, o branqueamento, que foi utilizado inicialmente no preparo das bebidas também prejudica a estabilidade dos FOS devido à hidrólise principalmente de GF3, GF4 e GF5 (Veja, Zuniga-Hansen, 2015; Campos et al., 2016; Topolska et al., 2017).

Essa hidrólise leva ao aumento do teor de glicose e, especialmente, de frutose. No entanto, glicose não foi detectada nas bebidas com 30 dias de fermentação, possivelmente por esse ser o carboidrato preferencial dos microrganismos no meio (Madigan et al., 2010), assim como frutose, o que também foi observado por Reina et al. (2015).

Contudo, apesar da perda de FOS após o tempo de fermentação, essa redução foi menor na bebida adicionada inicialmente de ácido cítrico, mesmo considerando a menor proporção da área para essa bebida, sugerindo menor degradação desse constituinte funcional.

3.3 Análises físico-químicas

As bebidas fermentadas de yacon foram avaliadas quanto ao pH, acidez

total titulável, sólidos solúveis totais, densidade e turbidez e os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Média e desvio padrão de pH, acidez total titulável (ml.g⁻¹), sólidos solúveis totais (SST - °Brix), densidade (g.ml⁻¹) e turbidez (UNT) das bebidas de yacon fermentadas espontaneamente com e sem agentes antiescurecimento.

Análises	Controle	Cisteína	Ácido cítrico
pH	4,06 ± 0,83 ^a	4,25 ± 0,13 ^a	3,47 ± 0,23 ^a
Acidez	1,47 ± 0,49 ^a	1,53 ± 0,15 ^a	1,97 ± 0,21 ^a
SST	7,13 ± 0,92 ^a	6,4 ± 0,20 ^a	5,93 ± 0,50 ^a
Densidade	1,05 ± 0,20 ^a	1,04 ± 0,06 ^a	1,04 ± 0,00 ^a
Turbidez	0,58 ± 0,03 ^a	0,47 ± 0,00 ^b	0,33 ± 0,02 ^c

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Duncan

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que, independente da presença ou não dos agentes antiescurecimento utilizados, pH, acidez total titulável, SST e densidade não variam estatisticamente ($p > 0,05$) entre as bebidas fermentadas.

A determinação do valor de pH indica o crescimento microbiológico e atividade enzimática relacionada à acidez ou alcalinidade das soluções (Cecchi, 2003). O pH da própria raiz é em torno de 6,0 que reduziu, sendo considerado ácido, devido ao processo de fermentação realizado pelas bactérias presentes no meio (Rodríguez et al., 2009a).

A acidez titulável serve como parâmetro de qualidade, pois, com o passar do tempo o produto é fermentado gerando compostos ácidos (Chim et al., 2013). Pelos resultados, a fermentação, independente do agente antiescurecimento inicialmente utilizado, gerou o mesmo teor de ácidos tituláveis ($p > 0,05$), sugerindo comportamento e composição semelhante dos microrganismos presentes nas bebidas.

Os SST são determinados pela refratometria em escala brix, que mede a quantidade de açúcares da fruta juntamente com a densidade AOAC (1997) e turbidez. Os açúcares tendem a diminuir de acordo com o tempo fermentativo uma vez que os microrganismos os utilizam como substrato energético liberando

energia. Os resultados semelhantes entre as bebidas ($p>0,05$) reforçam o comportamento e a composição semelhante entre os microrganismos presentes nas bebidas.

A turbidez esta intimamente ligada às propriedades ópticas que a bebida apresenta em absorver ou refletir a luz (Szutowska et al., 2020). Com a formação de melanoidinas (compostos de coloração escura) maior turbidez foi encontrada na bebida controle.

3.4 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

As bebidas de yacon fermentadas espontaneamente também foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante por meio de 3 métodos, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Média e desvio padrão do teor de compostos fenólicos totais (CFT - mg EAG.g⁻¹), e atividade antioxidante (%I) das bebidas de yacon fermentadas espontaneamente com e sem agentes antiescurecimento.

Análises	Controle	Cisteína	Ácido cítrico
CFT	0,12 ± 0,03 ^c	0,44 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,02 ^b
ABTS	6,58 ± 1,23 ^c	16,85 ± 2,03 ^b	28,24 ± 4,37 ^a
DPPH	8,42 ± 2,38 ^c	17,83 ± 1,60 ^b	23,75 ± 0,16 ^a
FRAP	7,22 ± 1,46 ^c	29,74 ± 1,04 ^b	33,74 ± 0,93 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Duncan.

A escolha dos agentes antiescurecimento e a dose utilizada foi baseada na literatura e no trabalho de Vasconcelos et al. (2015). Juntamente com o agente antiescurecimento foi realizado o branqueamento nas fatias de yacon com objetivo também de inativar as enzimas polifenoloxidasas (PPO), preservando os compostos fenólicos e reduzir leveduras indígenas (Narai-Kanayama et al., 2007; McCabe et al., 2015; Reina et al., 2015).

O yacon é rico em PPO que, em contato com oxigênio, oxida os compostos fenólicos da raiz, levando à formação de compostos intermediários denominados quinonas, que sofrem novas reações até obtenção de polímeros escuros, as melanoidinas (Valentová, Ulrichová, 2003).

A cisteína é um aminoácido que impede a formação de melanoidinas nos

vegetais, agindo com a quinona, formando compostos incolores e estáveis (Basunia, Abe, 2001), inibindo, portanto, o escurecimento enzimático e preservando os substratos dessa reação, os compostos fenólicos.

O ácido cítrico atua como agente quelante e redutor do pH. Ambas ações impedem a atuação da PPO, mais especificamente da peroxidase, por meio da indisponibilidade do seu cofator cobre, no sítio ativo da enzima, inibindo-a, e na diminuição geral do pH do meio (Gacche et al., 2004), retardando ou inativando a ação enzimática.

Em relação ao teor de compostos fenólicos, a bebida controle foi a que teve menor preservação. As raízes de yacon escurecem rapidamente devido à presença de importantes quantidades desses compostos em sua composição (Simonovska et al., 2003; Arnao et al., 2011) e a bebida controle foi preparada sem nenhum agente antiescurecimento para inibir esse processo, apenas utilizando o branqueamento, que isoladamente, não foi tão eficiente na redução do escurecimento enzimático. Por outro lado, a bebida de yacon preparada com ácido cítrico apresentou o maior conteúdo dos compostos fenólicos ($p \leq 0,05$) sugerindo que a inativação das PPO por esse ácido foi irreversível e mais efetiva.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários com potencial antioxidante que agem diretamente no combate ao radical livre. Em geral os alimentos ricos em compostos fenólicos podem atuar de maneira benéfica na saúde da população, uma vez que sua ação antioxidante reduz a oxidação lipídica dos tecidos vegetal e animal (Angelo, Jorge, 2007).

Quando introduzido na alimentação não mantém apenas a qualidade do alimento, mas principalmente reduz o risco de doenças como arteriosclerose e câncer de cólon, mama, esôfago, pulmão, fígado e pele (Angelo, Jorge, 2007), por isso, é de suma importância a sua preservação no processamento e armazenamento de alimentos.

Além do teor de compostos fenólicos de um alimento, faz-se importante analisar qual a capacidade de eliminação dos radicais livres esses compostos possuem. Os métodos de atividade antioxidante mais utilizados em alimentos são o FRAP, ABTS, DPPH e ORAC. Recomenda-se que pelo menos dois destes ensaios sejam combinados para fornecer uma informação confiável da atividade antioxidante total de um alimento (Dionisio et al., 2016). Desta forma, três destes métodos (FRAP, ABTS e DPPH) foram utilizados para analisar a bebida de

yacon fermentadas e eles apresentaram resultados compatíveis.

Todos os métodos indicaram que a bebida de yacon acrescida inicialmente de ácido cítrico apresentou a maior atividade ($p \leq 0,05$), sendo portanto, mais eficiente seu potencial antioxidante, seguida da bebida com cisteína.

Segundo Schiozer (2013), a estabilidade da cor destes pigmentos é afetada fortemente pelo pH e temperatura, sendo normalmente mais estáveis sob condições ácidas; assim a maior quantidade de antioxidantes encontrado na bebida com ácido cítrico pode estar relacionada a ação do ácido cítrico na inibição da PPO, tendo assim redução do escurecimento oxidativo ou enzimático (Ribeiro, 2008; Padilha et al., 2009).

3.5 Avaliação da toxicidade aguda por *C.elegans*

As bebidas fermentadas de yacon foram avaliadas quanto à toxicidade com nematódeos *C.elegans* e os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Média e desvio padrão do percentual de sobrevivência e tamanho dos nematódeos de *C.elegans* das bebidas fermentadas de yacon com e sem agente antiescurecimento.

Bebidas	Controle	Cisteína	Ácido cítrico
% sobrevivência	100,00	100,00	98,22
Tamanho (mm)	5.126 ± 2.092 ^b	8.448 ± 2.021 ^b	13.534 ± 8.457 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

Mesmo sendo uma espécie sensível à toxicidade de várias substâncias, os tratamentos não causaram aumento da taxa de mortalidade ou diminuição no desenvolvimento dos nematódeos de *C. elegans*. É importante salientar que em todas as placas preparadas e quantificadas, obtivemos 100% de sobrevivência, com exceção de apenas uma amostra contendo a bebida de ácido cítrico, o que fez reduzir a média.

Notadamente, também foi observado aumento da área corporal dos nematódeos tratados com a bebida preparada com o ácido cítrico ($p \leq 0,05$) quando comparado às bebidas controle e com cisteína, chegando a ter um

tamanho de, aproximadamente, 2,6 e 1,6 vezes menor que a bebida com ácido cítrico, respectivamente, como é possível observar na Figura 1.



Figura 1. Fotografias de vermes adultos presente na bebida de yacon fermentada espontaneamente, sendo a bebida controle (A), com cisteína (B) e com ácido cítrico (C).

Os microrganismos, principalmente as bactérias, são as principais fontes de nutrientes para *C. elegans*, podendo ser utilizado diretamente como alimento ou, ainda, como agente que atua no processamento de substratos, fornecendo compostos importantes para o metabolismo dos vermes (Schulenburg, Félix, 2017).

O yacon é rico em fibras prebióticas que estimulam o crescimento microbiano benéfico, além do elevado teor de compostos fenólicos, antioxidantes naturais que combatem os radicais livres prevenindo a morte celular (Takenaka et al., 2003; Vanini et al., 2009).

O ácido cítrico é um ácido orgânico de baixa toxicidade muito utilizado nas indústrias alimentícias principalmente em rações, a fim de melhorar o desempenho, crescimento e evitar o surgimento de bactérias patogênicas (Kubicek, Röhr, 1998; Partanen, Mroz, 1999). Estudos apontam o bom desempenho em relação ao crescimento e nutrição de animais através de aditivos com ácidos orgânicos em rações, em que o ácido cítrico presente gerou resultados significativos quanto a sua ação (Sugiura et al., 1998; Vielma et al., 1999; Boling et al., 2000a, 2000b; Boling-Frankenbach et al., 2001; Khajepour, Hosseini, 2012).

Além deles, também há na literatura estudos que apontam resultados promissores na digestão e absorção de minerais através da adição do ácido cítrico. Os efeitos fisiológicos desses ácidos se devem ao estímulo aumentado da produção de ácido clorídrico (HCl) e de enzimas que participam do processo

de digestão de proteína ou cátions quelantes promovendo maior absorção dos minerais (Øverland et al., 2000; Boling-Frankenbach et al., 2001; Anjum, Chaudhry, 2010).

Em função desses achados os *C. elegans* possuem um sistema digestivo completo no qual se alimentam de microrganismos e nutrientes fornecidos pelo alimento. Tais aspectos estão diretamente ligados a sua nutrição e desenvolvimento desde que possuam um meio nutritivo e seguro para isso (Leung et al., 2008; Fitzgerald et al., 2009; Hunt, 2017). De acordo com os resultados obtidos, os benefícios foram possíveis devido aos componentes fornecidos pela bebida fermentada de yacon, especialmente com adição do ácido cítrico.

Desta forma, pode-se considerar que todas as bebidas produzidas e avaliadas após 30 dias de fermentação, não apresentaram toxicidade aguda *in vivo* frente aos ensaios de mortalidade e desenvolvimento do *C. elegans*, indicando que podem ser consumidas por humanos. Somado a isso, pode-se sugerir um efeito simbiótico da bebida que naturalmente possui FOS, considerados prebióticos pela ANVISA (2019) e que podem ter favorecido na bebida, a proliferação de microrganismos benéficos à saúde, os probióticos. Contudo, reforçamos a necessidade de mais investigações, especialmente em relação à identificação dos microrganismos presentes nas bebidas.

4. CONCLUSÃO

As bebidas de yacon fermentada espontaneamente apresentaram resultados semelhantes ($p > 0,05$) de pH, acidez, SST, densidade e turbidez, independente da presença ou não de agente antiescurecimento. No entanto, observamos que em relação à área registrada de FOS, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, a bebida de yacon tratada inicialmente com ácido cítrico, apresentou menores perdas desses constituintes com o processo de fermentação.

Quanto ao teste de toxicidade, as 3 bebidas podem ser consideradas não tóxicas devido à ausência de mortalidade. No entanto, a bebida tratada com ácido cítrico teve maior desenvolvimento dos vermes, possivelmente pela junção da composição nutricional, compostos fenólicos e antioxidantes presentes na bebida.

Portanto, as 3 bebidas fermentadas possuem compostos nutricionais e bioativos preservados, não oferecem riscos a saúde quando consumida, podendo ser disponibilizada no mercado como mais um novo produto tecnológico visando a qualidade de vida, pela sua ação prebiótica e funcional agindo simbioticamente com microrganismos no organismo humano, podendo auxiliar na promoção, prevenção e redução de risco de doenças crônicas não transmissíveis, entretanto, a bebida tratada com ácido cítrico pode ser mais interessante quando comparado o potencial de crescimento dos vermes, preservação de FOS, dos compostos fenólicos e por apresentar maior atividade antioxidante.

5. REFERÊNCIAS

- Adriano, L.S., Dionísio, A.P., de Abreu, F.A.P., Carioca, A.A.F., Zocolo, G.J., Wurlitzer, N.J., de Oliveira Pinto, C., de Oliveira, A.C., de Carvalho Sampaio, H.A., 2019. Yacon syrup reduces postprandial glycemic response to breakfast: a randomized, crossover, double-blind clinical trial. *Food Res. Int.* 126, 108682.
- Angelo, P.M., Jorge, N., 2007. Phenolic compounds in foods-A brief review. *Rev. do Inst. Adolfo Lutz* 66, 1–9.
- Anjum, M.S., Chaudhry, A.S., 2010. Using enzymes and organic acids in broiler diets. *J. Poult. Sci.* 1001160036.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária): Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes. v.1, n. 23, 2019.
- ANVISA, 2002. Rdc No 02, De 07 De Janeiro De 2002. D.O.U. 2002.
- AOAC (Association of official analytical chemists) official methods of analysis. 2000. Univ. Michigan, Assoc. Off. Analytical Chem.
- AOAC (Association of official analytical chemists) official methods of analysis. 2005. Int. 18th ed, Gaithersburg, Maryland, USA 45, 75–76.
- Apolinário, A.C., de Lima Damasceno, B.P.G., de Macêdo Beltrão, N.E., Pessoa, A., Converti, A., da Silva, J.A., 2014. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydr. Polym.* 101, 368–378.
- Arnao, I., Seminario, J., Cisneros, R., Trabucco, J., 2011. Potencial antioxidante

- de 10 accesiones de yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca-Perú, in: *Anales de La Facultad de Medicina. UNMSM. Facultad de Medicina*, pp. 239–243.
- Augusti, P.R., Brasil, A.V.S., Souto, C., Göethel, G., de Oliveira Rios, A., Emanuelli, T., Bürger, M.E., Garcia, S.C., 2017. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food Chem. Toxicol.* 109, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.045>
- Avila, D.S., Benedetto, A., Au, C., Manarin, F., Erikson, K., Soares, F.A., Batista, J., Rocha, T., Aschner, M., 2012. Organotellurium and Organoselenium Compounds attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* by preventing oxidative stress. *Radic Biol Med* 52, 1903–1910. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.044>
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6657–6662. <https://doi.org/10.1021/jf034790i>
- Azevedo, P.S.R. de, Dorneles, T.C., 2018. Estabilidade de Yacon (*smallanthus sonchifolius*) minimamente processado.
- Basunia, M.A., Abe, T., 2001. Thin-layer solar drying characteristics of rough rice under natural convection. *J. Food Eng.* 47, 295–301.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1039/c6ay01739h>
- Bloor, S.J., 2001. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 3–14.
- Boling-Frankenbach, S.D., Snow, J.L., Parsons, C.M., Baker, D.H., 2001. The effect of citric acid on the calcium and phosphorus requirements of chicks fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 80, 783–788.
- Boling, S.D., Douglas, M.W., Snow, J.L., Parsons, C.M., Baker, D.H., 2000a. Citric acid does not improve phosphorus utilization in laying hens fed a corn-soybean meal diet. *Poult. Sci.* 79, 1335–1337.
- Boling, S.D., Webel, D.M., Mavromichalis, I., Parsons, C.M., Baker, D.H., 2000b. The effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks

- and pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 682–689.
- Brenner, S., 1974. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07894.x>
- Caetano, B.F.R., de Moura, N.A., Almeida, A.P.S., Dias, M.C., Sivieri, K., Barbisan, L.F., 2016. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. *Nutrients* 8. <https://doi.org/10.3390/nu8070436>
- Campos, D., Aguilar-Galvez, A., Pedreschi, R., 2016. Stability of fructooligosaccharides, sugars and colour of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots during blanching and drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51, 1177–1185.
- Cao, Y., Ma, Z.F., Zhang, H., Jin, Y., Zhang, Y., Hayford, F., 2018. Phytochemical Properties and Nutrigenomic Implications of Yacon as a Potential Source of Prebiotic: Current Evidence and Future Directions. <https://doi.org/10.3390/foods7040059>
- Carbonera, N., Espírito Santo, M.L.P., 2010. Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação da anchoita (*Engraulis anchoita*) fermentada.
- Cecchi, H.M., 2003. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Editora da UNICAMP.
- Chandrashekar, P.M., Prashanth, K.V.H., Venkatesh, Y.P., 2011. Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract. *Phytochemistry* 72, 255–264.
- Charão, M.F., Souto, C., Brucker, N., Barth, A., Jornada, D.S., Fagundes, D., Ávila, D.S., Eifler-Lima, V.L., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Garcia, S.C., 2015. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5093–5106. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84909>
- Chen, H., Xiao, G., Xu, Y., Yu, Y., Wu, J., Zou, B., 2019. High hydrostatic pressure and co-fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* and *Gluconacetobacter xylinus* improve flavor of yacon-litchi-longan juice. *Foods* 8, 308.
- Chim, J.F., Zambiasi, R.C., RODRIGUES, R. da S., 2013. Estabilidade da vitamina C em néctar de acerola sob diferentes condições de

- armazenamento. Rev. Bras. Prod. Agroindustriais 15, 321–327.
- Da Silva, N., 2007. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Varela.
- Dahal, S., Ojha, P., Karki, T.B., 2020. Functional quality evaluation and shelf life study of synbiotic yacon juice. Food Sci. Nutr. 8, 1546–1553.
- Das Graças Vaz-Tostes, M., Viana, M.L., Grancieri, M., dos Santos Luz, T.C., de Paula, H., Pedrosa, R.G., Costa, N.M.B., 2014. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children. Nutrition 30, 666–672.
- Delgado, G.T.C., Tamashiro, W.M. da S.C., Junior, M.R.M., Pastore, G.M., 2013. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. Plant Foods Hum. Nutr. 68, 222–228.
- Delgado, G.T.C., Tamashiro, W.M.S.C., Pastore, G.M., 2010. Immunomodulatory effects of fructans. Food Res. Int. 43, 1231–1236.
- Dionisio, A.P., Wurlitzer, N.J., Garruti, D., 2016. Stability of a functional beverage composed by tropical fruits and yacon (*Smallanthus sonchiyolius*) under refrigerated storage. Arch. Latinoam. Nutr. 66, 148–155.
- Evangelista, S.R., Miguel, M.G. da C.P., Silva, C.F., Pinheiro, A.C.M., Schwan, R.F., 2015. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. Int. J. Food Microbiol. 210, 102–112.
- Fitzgerald, V.K., Mensack, M.M., Wolfe, P., Thompson, H.J., 2009. Short Technical Reports. <https://doi.org/10.2144/000113277>
- Fujishima, M., Furuyama, K., Ishihiro, Y., Onodera, S., Fukushi, E., Benkeblia, N., Shiomi, N., 2009. Isolation and structural analysis in vivo of newly synthesized fructooligosaccharides in onion bulbs tissues (*Allium cepa* L.) during storage. Int. J. Carbohydr. Chem. 2009.
- Gacche, R.N., Warangkar, S.C., Ghole, V.S., 2004. Glutathione and cinnamic acid: natural dietary components used in preventing the process of browning by inhibition of polyphenol oxidase in apple juice. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 19, 175–179.
- Guigoz, Y., Rochat, F., Perruisseau-Carrier, G., Rochat, I., Schiffrin, E.J., 2002. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. Nutr. Res. 22, 13–25.
- Horwitz, W., 2000. AOAC (Association of official analytical chemists) official

- methods of analysis. Univ. Michigan, Assoc. Off. Analytical Chem.
- Horwitz, W., Latimer, G., 2005. AOAC-Association of official analytical chemists. Off. Methods Anal. AOAC Int. 18th ed, Gaithersburg, Maryland, USA 45, 75–76.
- Hunt, P.R., 2017. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.* 37, 50–59.
- Khajepour, F., Hosseini, S.A., 2012. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquac. Res.* 43, 407–411.
- Kotovicz, V., 2011. Otimização da desidratação osmótica e secagem do yacon (*Polymnia sonchifolia*).
- Krüger, R., Kempka, A.P., Oliveira, D. de, Valduga, E., Cansian, R.L., Treichel, H., DI LUCCIO, M., 2008. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. *Aliment. e Nutr.* 19, 43–53.
- Kubicek, C.P., Röhr, M., 1998. Citric acid production. *Commer. Ferment. Nutr. needs their Microorg.* Esteekey Assoc. Inc., Milwaukee, Wis 236–257.
- Leung, M.C.K., Williams, P.L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K.J., Aschner, M., Meyer, J.N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* 106, 5–28.
- Lewu, M.N., Adebola, P.O., Afolayan, A.J., 2010. Comparative assessment of the nutritional value of commercially available cocoyam and potato tubers in South Africa. *J. Food Qual.* 33, 461–476.
- Machado, A.M., Silva, N.B.M. da, Freitas, R.M.P. de, Freitas, M.B.D. de, Chaves, J.B.P., Oliveira, L.L., Martino, H.S.D., Alfenas, R. de C.G., 2020. Effects of yacon flour associated with an energy restricted diet on intestinal permeability, fecal short chain fatty acids, oxidative stress and inflammation markers levels in adults with obesity or overweight: a randomized, double blind, placebo controlled clinical trial. *Arch. Endocrinol. Metab.*
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P. V, Clark, D.P., 2010. *Microbiologia de Brock.* 12a. Ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, RS 1160.
- Manrique, I., 2005. Jarabe de yacón: Principios y procesamiento. International Potato Center.
- Marcon, L.D.N., de Sousa Moraes, L.F., dos Santos Cruz, B.C., de Oliveira

- Teixeira, M.D., Bruno, T.C.V., Ribeiro, I.E., Messias, A.C., Ferreira, C.L. de L.F., de Oliveira, L.L., Peluzio, M. do C.G., 2019. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-based product increases fecal short-chain fatty acids and enhances regulatory T cells by downregulating ROR γ t in the colon of BALB/c mice. *J. Funct. Foods* 55, 333–342.
- Marques, C., Wojeicchowski, J.P., Cardoso, T., Mafra, M.R., Mitterer-Daltoé, M.L., Masson, M.L., 2020. Lactobionic acid as a suitable food preservative for yacon juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 102400.
- McCabe, L., Britton, R.A., Parameswaran, N., 2015. Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Curr. Osteoporos. Rep.* 13, 363–371. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0292-x>
- Mohan, N., Chen, C.-S., Hsieh, H.-H., Wu, Y.-C., Chang, H.-C., 2010. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett.* 10, 3692–3699.
- Narai-Kanayama, A., Tokita, N., Aso, K., 2007. Dependence of fructooligosaccharide content on activity of fructooligosaccharide-metabolizing enzymes in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuberous roots during storage. *J. Food Sci.* 72, S381–S387.
- Oliveira, G.O., Braga, C.P., Fernandes, A.A.H., 2013. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.)] treatment. *Food Chem. Toxicol.* 59, 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.050>
- Øverland, M., Granli, T., Kjos, N.P., Fjetland, O., Steien, S.H., Stokstad, M., 2000. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 1875–1884.
- Padilha, V.M., Rolim, P.M., Salgado, S.M., Livera, A.V.S., Oliveira, M.G. de, 2009. Avaliação do tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. *Ciência Rural* 39, 2178–2184.
- Partanen, K.H., Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 12, 117–145.

- Pereira, D.I.A., Gibson, G.R., 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 259–281. <https://doi.org/10.1080/10409230290771519>
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., Cerón, J., 2012. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *JoVE (Journal Vis. Exp.)* e4019.
- Reina, L.D., Guija, E., Reategui, O., Parodi, C., Encizo, J., 2009. Yacon preservation by natural fermentation. *Científica* 6, 221–231.
- Reina, L.D., Pérez-Díaz, I.M., Breidt, F., Azcarate-Peril, M.A., Medina, E., Butz, N., 2015. Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.007>
- Ribeiro, J.D.E.A., 2008. Estudo químico e bioquímico do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in natura e processado e influência do seu consumo sobre níveis glicêmicos e lipídios fecais de ratos. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2008.
- Rivera, D., Manrique, I., 2005. Zumo de Yacón. Ficha Técnica.
- Rodríguez, H., Antonio, J., María, J., De, B., López, F., Felipe, D., Gómez-cordovés, C., Miguel, J., Muñoz, R., 2009a. International Journal of Food Microbiology Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., de Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R., 2009b. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 79–90.
- Ross, N.C.R., 2019. Elaboração de chips de batata yacon (*smallanthus sonchifolius*) com a utilização combinada de xilitol, sorbitol e maltitol como solutos da desidratação osmótica.
- Sacramento, S.M., Silva, P., Tavares, M.I.B., 2017. Batata yacon alimento funcional. *Semioses* 11.
- Santana, I., Cardoso, M.H., 2008. Yacon tuberous root (*Smallanthus sonchifolius*): Cultivation potentialities, technological and nutritional aspects. *Ciência Rural* 38, 898–905.
- Scherer, R., Godoy, H.T., 2009a. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 112, 654–658.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>

- Scherer, R., Godoy, H.T., 2009b. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 112, 654–658. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Schiozer, A.L., Barata, L.E.S., 2013. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal.
- Schulenburg, H., Félix, M.-A., 2017. The natural biotic environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 206, 55–86.
- Silva, C.F., Vilela, D.M., de Souza Cordeiro, C., Duarte, W.F., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2013. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 235–247.
- Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K., Ulrichová, J., 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *J. Chromatogr. A* 1016, 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01183-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01183-X)
- Sugiura, S.H., Dong, F.M., Hardy, R.W., 1998. Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. *Aquaculture* 160, 283–303.
- Takenaka, M., Yan, X., ONO, H., Yoshida, M., Nagata, T., Nakanishi, T., 2003. Caffeic Acid Derivatives in the Roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) 793–796.
- Topolska, K., Filipiak-Florkiewicz, A., Florkiewicz, A., Cieslik, E., 2017. Fructan stability in strawberry sorbets in dependence on their source and the period of storage. *Eur. food Res. Technol.* 243, 701–709.
- Torres, D.L.H., 2019. Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae* L.) por quatro linhagens probióticas.
- Ueda, Y., Apiphuwasukcharoen, N., Tsutsumi, S., Matsuda, Y., Areekul, V., Yasuda, S., 2019. Optimization of hot-water extraction of dried yacon herbal tea leaves: enhanced antioxidant activities and total phenolic content by response surface methodology. *Food Sci. Technol. Res.* 25, 131–139.
- Valentová, K., Ulrichová, J., 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii*-prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases.

Biomed. Pap. 147, 119–130.

- Vanini, M., Barbieri, R.L., Ceolin, T., Heck, R.M., Mesquita, M.K., 2009. A relação do tubérculo andino yacon com a saúde humana. *Ciência, Cuid. e Saúde* 8, 92–96.
- Vasconcelos, C.M., de Oliveira, E.B., Rossi, S.N., Arantes, L.F., Puschmann, R., Chaves, J.B.P., 2015. Evaluating strategies to control enzymatic browning of minimally processed yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food bioprocess Technol.* 8, 1982–1994.
- Vasconcelos, C.M., Silva, C.O. da, Teixeira, L.J.Q., Chaves, J.B.P., Martino, H.S.D., 2010. Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev. do Inst. Adolfo Lutz* 69, 188–193.
- Vega, R., Zuniga-Hansen, M.E., 2015. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. *Food Chem.* 173, 784–789.
- Vielma, J., Ruohonen, K., Lall, S.P., 1999. Supplemental citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).
- Vilhena, S.M.C., Câmara, F.L.A., Kakihara, S.T., 2000. O cultivo de yacon no Brasil. *Hortic. Bras.* 18, 5–8. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362000000100002>
- Vogt, L., Ramasamy, U., Meyer, D., Pullens, G., Venema, K., Faas, M.M., Schols, H.A., de Vos, P., 2013. Immune modulation by different types of β 2→1-fructans is toll-like receptor dependent. *PLoS One* 8, e68367.
- Watt, B.K., Merrill, A.L., 1964. Composition of foods: raw, processed, prepared. Consumer and Food Economics Research Division, Agricultural Research Service
- Whelan, K., 2013. Mechanisms and effectiveness of prebiotics in modifying the gastrointestinal microbiota for the management of digestive disorders. *Proc. Nutr. Soc.* 72, 288–298.