



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

NARA MENEZES VIEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS MISTAS DE FRUTAS TROPICAIS E YACON
COMO FONTE DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS

FORTALEZA
2014

NARA MENEZES VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS MISTAS DE FRUTAS TROPICAIS E YACON
COMO FONTE DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo.

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Dionísio.

FORTALEZA
2014

NARA MENEZES VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS MISTAS DE FRUTAS TROPICAIS E YACON
COMO FONTE DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo
ORIENTADOR

Dra. Ana Paula Dionísio
CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa
MEMBRO

Dra. Luciana de Siqueira Oliveira
MEMBRO

Profa. Dra. Socorro Vanesca Frota Gaban
MEMBRO

A Deus.

*Aos meus amados pais,
César e Silvia.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ser minha luz e força, por estar sempre presente em todos os momentos ao meu lado, e por ter permitido a execução e o término deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, a todo corpo docente que participou da minha formação desde a graduação, e a todos os que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao meu orientador professor Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo, pela orientação, confiança e amizade, e por ser um exemplo de profissional a se espelhar.

À minha co-orientadora Dra. Ana Paula Dionísio, pela confiança, orientação, amizade, apoio, paciência e ajuda prestados durante todo o período do mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, pelo financiamento do projeto e pela estrutura, que permitiram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG pela parceria no projeto, apoio e infraestrutura fornecidos para a realização de uma etapa deste trabalho.

Aos pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical, Dra. Ana Paula Dionísio, Dr. Nédio Jair, Dra. Socorro Bastos, Dra. Fátima Borges, Dra. Débora Garruti pela amizade e confiança em mim depositados, permitindo a realização deste projeto de mestrado, além do incentivo, apoio técnico e científico, que foram de grande importância para o meu crescimento profissional e intelectual.

Aos analistas e técnicos da Embrapa Agroindústria Tropical, Adna Girão, Ídila Araújo, Hilton César, Fernando Abreu e Márcia Régia pela amizade, paciência, atenção e apoio a mim dedicados.

Ao Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa, Dra. Luciana de Siqueira Oliveira, e Dra. Socorro Vanesca Frota, por terem aceitado o convite de participar desta banca de defesa de dissertação, contribuindo assim para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários da Unifal que estiveram envolvidos nesse trabalho (Dra. Marisa Ionta, Dra. Maisa Brigagão, Dr. Valdemar Paffaro Júnior, Patrícia e Gabriel), em especial

ao professor Dr. Luciano Bruno pelo suporte e parceria no projeto, pela orientação, amizade, paciência e apoio nas análises *in vivo*.

Aos alunos da Unifal envolvidos no trabalho (Gustavo Pierroti, Ana Cláudia, José Luiz, Debora, Carla, Évila, Guilherme e Fernando) e pela convivência fraternal diária (Caroline Ronchini, Débora Piola e Mara Ávila), em especial à Angélica Simões e Débora Cunha, pela amizade construída, pelo apoio incondicional, por todos os momentos de alegria e sufoco compartilhados, pela imensa paciência e boa vontade em ajudar, por tudo que vivi e aprendi com vocês, pois sem vocês eu jamais teria conseguido realizar uma parte do trabalho sozinha! Serei eternamente grata!

A todos os colegas e amigos bolsistas e estagiários dos Laboratórios de Fisiologia e Tecnologia Pós-colheita, Análise Sensorial, Análise de Alimentos, Água e Solos, e Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical, em especial a Ana Carolina, Ana Ranielle, Jéssika e Talita, por sempre poder contar com o apoio, amizade e dedicação de vocês na realização dos processamentos e das análises.

A todos os meus colegas de turma do mestrado, em especial à Karol pela amizade, paciência e apoio durante o curso.

Aos meus amigos Alinne, Carol, Cecília, Denise Josino, Elígenes, Evani, Karine, Jéssica, Jéssika, Marcinha, Marisa, Morgana, Natália, Rafaela, Raquel, Thayane e Victor pela amizade, companheirismo, apoio, paciência e compreensão nos meus momentos de ausência.

Aos meus pais César Vieira e Silvia Menezes e ao meu irmão César pelo apoio incondicional durante toda a minha vida acadêmica, pelos conselhos, pelas orações, por sempre se fazerem presentes em minha vida, pelos ensinamentos, por nunca medirem esforços para me ajudar, por todo o amor, carinho, paciência e atenção que sempre a mim dedicaram.

À minha família, pela força, apoio, incentivo e compreensão das minhas ausências.

Ao meu namorado Abel, pelo apoio, compreensão, incentivo, paciência e companheirismo.

A todos àqueles que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos! Que Deus os abençoe!

Muito Obrigada!

“Aceite com sabedoria o fato de que o caminho está cheio de contradições. Há momentos de alegria e desespero, confiança e falta de fé, mas vale a pena seguir adiante.”

– Paulo Coelho

RESUMO

VIEIRA, Nara Menezes. **Desenvolvimento de bebidas mistas de frutas tropicais e yacon como fonte de oligossacarídeos prebióticos**. 2014. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver duas bebidas de frutas tropicais e extrato de yacon, com funcionalidade comprovada através de ensaios *in vivo*. Primeiramente foi estudada a atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) presente no yacon, os valores de pH de estabilidade e de atividade dessa enzima e o processamento para obtenção do extrato de yacon com inativação de sua atividade enzimática. Para esta última etapa foram utilizados os ácidos cítrico e ascórbico, em diferentes concentrações e tempos de imersão, definidos de acordo com um planejamento estatístico do tipo DCCR 2² (Delineamento Central Composto Rotacional). Os resultados indicaram que a imersão do extrato de yacon por 2 minutos em ácido ascórbico (na concentração de 4,6%), ou por 8 minutos em ácido cítrico (na concentração de 2,4%) foi suficiente para reduzir a atividade da PPO, demonstrando que os dois ácidos estudados foram capazes de inativar a referida enzima, o que viabilizou a obtenção de um extrato de yacon com inativação da enzima PPO e manutenção dos componentes funcionais e de suas características. Uma segunda etapa do estudo consistiu no desenvolvimento, processamento térmico de formulações de polpas de frutas e extrato de yacon, e caracterização das bebidas formuladas. Foram desenvolvidas 22 formulações (11 de frutas tropicais e extrato de yacon, e 11 de caju e extrato de yacon), sendo a concentração das variáveis “concentração de extrato de yacon” e “concentração do edulcorante estévia” determinadas de acordo com um delineamento estatístico do tipo DCCR 2². Através da superfície de resposta foi possível visualizar as concentrações de edulcorante e de extrato de yacon que resultaram em maior aceitabilidade das bebidas. Com base nos resultados obtidos foram selecionadas duas formulações, denominadas Bebida A (bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon), e Bebida B (bebida prebiótica de caju e yacon). Essas formulações foram pasteurizadas e caracterizadas quanto aos compostos bioativos e teor de fruto-oligossacarídeos (FOS). Além disso, foram feitas análises microbiológica e de capacidade antiproliferativa das bebidas. Os resultados mostraram que a Bebida A apresentou cerca do dobro de atividade antioxidante (Folin-Ciocalteu: 126,83, ABTS^{•+}: 10,57, FRAP: 33,45 e DPPH[•]:

866,36) quando comparada à Bebida B (Folin-Ciocalteu: 66,52, ABTS^{•+}: 6,45, FRAP: 15,58 e DPPH[•]: 1780,14). Quanto ao teor de FOS, ambas as bebidas apresentaram valores acima do mínimo exigido pela legislação para ter alegação funcional comprovada (4,64 g /200 ml para a bebida de frutas tropicais e yacon, e 5,94 g /200 ml para a bebida de caju e yacon). A análise microbiológica não constatou presença de fungos filamentosos, coliformes fecais, *E.coli* e *Salmonella* nas amostras avaliadas, indicando segurança microbiológica no processamento. Para a atividade antiproliferativa a Bebida B apresentou melhores resultados para inibição do desenvolvimento de células tumorais (HepG₂) em condições *in vitro*. A terceira e última etapa desse trabalho consistiu de testes *in vivo* com ratos Wistar induzidos ao diabetes por aloxano e tratados por gavagem com as Bebidas A e B liofilizadas e reconstituídas em água nas concentrações de 100, 200 e 400mg/kg de peso corpóreo, durante 30 dias. Foram avaliados os parâmetros nutricionais de ganho de peso, consumo da dieta e glicemia, atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) no fígado e quantificação de lactobacilos no material cecal dos animais. Os animais tratados com a Bebida B na concentração de 100 mg/kg p.c (G6) apresentaram melhor resultado de redução de glicemia quando comparados aos outros tratamentos. Quanto à presença de *Lactobacillus* spp. foram quantificados 9,16 log₁₀ ufc/g no grupo G6, 9,2 log₁₀ ufc/g no grupo G7 e 10,41 log₁₀ ufc/g no grupo G8. Os resultados sugerem que o consumo da bebida de caju e yacon desenvolvida neste trabalho foi eficaz na redução dos valores de glicemia, indicando que a bebida de caju e yacon pode ser uma alternativa para o controle do diabetes.

Palavras-chave: *Smallanthus sonchifolius*, fruto-oligossacarídeos, compostos bioativos, diabetes, bebidas mistas.

ABSTRACT

The aim of this research was to develop two beverages of tropical fruits and yacon extract with functionality evidenced by *in vivo* tests. First the enzymatic activity of polyphenol oxidase (PPO) from yacon extract was studied as well as the optimum pH stability and optimum pH activity was studied too. The enzymatic inactivation was performed with citric and ascorbic acids at different concentrations and immersion times, defined according to a statistical design type CCD 2² (central composite design). The results showed that immersion of yacon extract for 2 minutes in ascorbic acid (4.6% concentration) or for 8 minutes in citric acid (2.4% concentration) were sufficient to reduce the PPO activity. Thus, the two acids studied were able to inactivate the enzyme and a yacon extract without PPO enzyme active was possible, with maintenance of functional components. A second stage of the study was to develop formulations and thermal processing of fruit pulp and yacon extracts, and the beverages characterization made by CCD design type 2². The evaluated variables were the concentrations of yacon extract and stevia, a natural sweetener. In this way, 22 formulations (11 of tropical fruits and yacon extract, and 11 of cashew apple and yacon extract) were developed with the concentration of the variables determined in accordance with the statistical design. Through the response surface, the sweetener and the yacon extract concentrations which resulted in greater acceptability of beverages were determined. The selected formulations were pasteurized and the content of bioactive compounds and fructo-oligosaccharides (FOS) was characterized. Furthermore, microbiological analysis and antiproliferative capacity of beverages were determined. The results showed that the Beverage A had nearly twice the antioxidant activity (Folin-Ciocalteu: 126.83, ABTS^{•+}: 10.57, FRAP: 33.45 and DPPH[•]: 866.3) compared to Beverage B (Folin-Ciocalteu: 66.52, ABTS^{•+}: 6.45, FRAP: 15.58 and DPPH[•]: 1780.14). The FOS content from both beverages had values above the minimum required by law to have proven functional claim (4.64 g / 200 ml for the beverage of tropical fruit and yacon and 5.94 g / 100 ml for cashew apple beverage and yacon). The microbiological analysis not detected filamentous fungi, fecal coliforms, *E. coli* or *Salmonella*, indicating a microbiological safety in processing. For the antiproliferative activity the Beverage B showed the best results for growth inhibition of tumor cells (HepG₂) by *in vitro* conditions. The last step of this work consisted of *in vivo* tests with Wistar rats alloxan-induced diabetes treated by gavage with Beverages A and B lyophilized and reconstituted in water at concentrations of

100, 200 and 400mg / kg per body weight, for 30 days. The nutritional parameters of weight gain, dietary intake and glucose, the activity of the antioxidant enzyme catalase (CAT) in the liver and quantification of lactobacilli in cecal material from animals were evaluated. The animals treated with the Beverage B at a concentration of 100 mg / kg b. w. (G6) showed better results in reduced blood glucose as compared to other treatments. Regarding the presence of Lactobacillus spp. were quantified (9.16 log₁₀ cfu / g in the G6 group, 9.2 log₁₀ cfu / g in the G7 group and 10.41 log₁₀ cfu / g in the G8 group). The results suggest that consumption of cashew apple and yacon beverage developed in this work was effective in reducing blood glucose levels, indicating that cashew apple and yacon beverage can be an alternative for the control of diabetes.

Keywords: *Smallanthus sonchifolius*, fructo-oligosaccharides, bioactive compounds, diabetes, alloxan-induced, mixed beverage.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Matriz do planejamento experimental completo (valores codificados e valores reais) dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico para inibição da atividade da PPO.....	53
Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental completo (valores codificados) dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico, com as respostas da atividade de polifenoloxidase.....	60
Tabela 3 – Coeficientes de regressão para a resposta da atividade da enzima polifenoloxidase dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico.....	60
Tabela 4 – ANOVA para a atividade da PPO dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico.....	61
Tabela 5 – Teor de fruto-oligossacarídeos no yacon sem tratamento e no yacon após os tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico, nas faixas de concentração e tempos ótimos de imersão.....	62

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Variações das concentrações de extrato de yacon e de estévia.....	74
Tabela 2 – Matriz do delineamento e respostas.....	80
Tabela 3 – Coeficientes de regressão do DCCR para aceitabilidade da bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A).....	80
Tabela 4 – Coeficientes de regressão do DCCR para aceitabilidade da bebida prebiótica de caju e yacon (Bebida B).....	81
Tabela 5 – ANOVA para a bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A).....	81
Tabela 6 – ANOVA para a bebida prebiótica de caju e yacon (Bebida B).....	81
Tabela 7 – Valores médios de pH, sólidos solúveis, acidez, umidade, cinzas e proteínas das duas bebidas desenvolvidas.....	85
Tabela 8 – Capacidade antioxidante total (TAC), fenólicos totais (TP) e açúcares das Bebidas A e B.....	86

CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Composição da ração oferecida aos animais utilizados no experimento (Ração Nuvilab CR1).....	102
---	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 – Cultivo do yacon em diversas partes do mundo.....27
- Figura 2 – Estrutura química dos principais fruto-oligossacarídeos.....32
- Figura 3 – Reações catalisadas pela PPO e formação de compostos escuros (melaninas).....34

CAPÍTULO 2

- Figura 1 – Fluxograma de processamento para obtenção de extrato de yacon.....54
- Figura 2 Faixa de pH ótimo de atividade (a); e pH de estabilidade (b) da enzima PPO do yacon após incubação por 18h a 5 °C.....56
- Figura 3 – Extrato de yacon sem tratamento (a) e com tratamento com ácido cítrico (b).....58
- Figura 4 – Ensaio do planejamento experimental, utilizando ácido ascórbico (Figura a) e ácido cítrico (Figura b) para inibir a atividade enzimática da polifenoloxidase.....59
- Figura 5 – Superfícies de resposta em função do tempo de imersão e das concentrações de ácido ascórbico (a) e ácido cítrico (b) para a atividade da enzima PPO.....61

CAPÍTULO 3

- Figura 1 – Superfície de resposta em função da concentração de edulcorante (%) e extrato de yacon (%), com valores codificados para os dois tipos de bebidas. (a) bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon e (b) bebida prebiótica de caju e yacon.....82
- Figura 2 – Histograma de frequência com valores hedônicos atribuídos a bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon.....83
- Figura 3 – Histograma de frequência com valores hedônicos atribuídos a bebida prebiótica de caju e yacon.....84
- Figura 4 – Viabilidade celular relativa (%) de células HepG₂ mediante exposição a diferentes concentrações da Bebida A.....88
- Figura 5 – Viabilidade celular relativa (%) de células HepG₂ mediante exposição a diferentes concentrações da Bebida B.....88

CAPÍTULO 4

- Figura 1 – Ganho de peso e consumo de dieta dos diferentes grupos experimentais.....105
- Figura 2 – Glicemia dos animais durante o período experimental.....106
- Figura 3 – Atividade da catalase nos fígados dos animais.....108

Figura 4 - Quantificação de lactobacilos no material cecal dos animais.....109

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.1 Alimentos funcionais e legislação	22
1.2 Sucos e frutas tropicais – fontes de antioxidantes naturais.....	23
1.2.1 Abacaxi.....	24
1.2.2 Açaí.....	24
1.2.3 Acerola	25
1.2.4 Cajá	25
1.2.5 Caju	25
1.2.6 Camu-camu	26
1.3 Yacon – fonte de oligossacarídeos prebióticos.....	26
1.4 Fruto-oligossacarídeos e compostos fenólicos no controle do diabetes	30
1.4.1. Fruto-oligossacarídeos (FOS)	30
1.4.2. Compostos fenólicos.....	32
1.5 Tratamento ácido para inibição da polifenoloxidase do yacon.....	33
1.6 Estévia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni).....	35
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2: PROCESSAMENTO DO YACON COM MANUTENÇÃO DAS SUAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E INATIVAÇÃO DAS ENZIMAS DE ESCURECIMENTO	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
2.1 INTRODUÇÃO	48
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	51

2.2.1 Matéria-prima	51
2.2.2 Obtenção do extrato enzimático aquoso de yacon.....	51
2.2.3 Determinação da atividade enzimática	51
2.2.4 Efeito do pH na atividade da PPO do yacon.....	51
2.2.5 Efeito do pH na estabilidade da PPO do yacon	52
2.2.6 Planejamento experimental e definição das condições de inibição do escurecimento enzimático	52
2.2.6.1. Preparo das amostras para o planejamento estatístico	53
2.2.6.2. Análise estatística.....	55
2.2.7 Teor de fruto-oligossacarídeos.....	55
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
2.3.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima PPO do yacon	56
2.3.2 Tratamento do yacon visando inibição do escurecimento enzimático	58
2.3.3 Fruto-oligossacarídeos	62
2.4 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS PREBIÓTICAS DE FRUTAS TROPICAIS E YACON.....	68
RESUMO.....	68
ABSTRACT	69
3.1 INTRODUÇÃO	70
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
3.2.1 Matéria prima.....	73
3.2.2 Desenvolvimento das bebidas prebióticas de frutas tropicais e yacon	73
3.2.3 Análise sensorial – aceitabilidade.....	74
3.2.4 Processamento térmico das bebidas selecionadas.....	75

3.2.5 Análises microbiológicas das bebidas pasteurizadas.....	75
3.2.6 Caracterização das bebidas prebióticas pasteurizadas	75
3.2.6.1 Caracterização físico-química.....	75
3.2.6.2 Compostos bioativos.....	76
<i>Ácido ascórbico</i>	76
<i>Conteúdo de polifenóis totais e atividade antioxidante total</i>	76
<i>Preparação dos extratos</i>	76
<i>Polifenóis totais (TP)</i>	77
<i>Capacidade antioxidante total (TAC) pelo método ABTS</i>	77
<i>Capacidade antioxidante total (TAC) pelo método DPPH'</i>	77
<i>Capacidade antioxidante total (TAC) pelo método FRAP</i>	78
3.2.6.3 Determinação de fruto-oligossacarídeos, sacarose, frutose e glicose	78
3.2.6.4 Inibição da atividade proliferativa de células HepG ₂	79
3.2.6.5 Análise estatística.....	79
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.3.1. Análises microbiológicas das bebidas pasteurizadas.....	83
3.3.2. Aceitabilidade das bebidas pasteurizadas	83
3.3.3. Análises físico-químicas e perfil de compostos bioativos das bebidas prebióticas pasteurizadas.....	85
3.3.4 . Determinação de fruto-oligossacarídeos, sacarose, frutose e glicose.....	87
3.3.5. Inibição da atividade antiproliferativa de células HepG ₂	87
3.4 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
CAPÍTULO 4: EFEITO HIPOGLICEMIANTE, ANTIOXIDANTE E PREBIÓTICO DE BEBIDAS DE FRUTAS TROPICAIS E YACON EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ALOXANO	97
RESUMO	97

ABSTRACT	98
4.1 INTRODUÇÃO	99
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	101
4.2.1 Formulação das bebidas prebióticas	101
4.2.2 Animais e delineamento experimental.....	102
4.2.3 Atividade da catalase do fígado	104
4.2.4 Determinação de lactobacilos no material cecal.....	104
4.2.5 Análise Estatística.....	104
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.3.1 Parâmetros nutricionais avaliados nos ratos induzidos ao diabetes.....	104
4.4 CONCLUSÕES	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
REFERÊNCIAS	113
Anexo 01 - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNIFAL/MG)	117

INTRODUÇÃO

O diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia decorrente de problemas na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambas. A hiperglicemia crônica de diabetes está associada a danos a longo prazo e à disfunção e falha de alguns órgãos, como olhos, rins, nervos, o coração e os vasos sanguíneos (PARK *et al.*, 2009; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças ocorre há milhares de anos e recentemente algumas dessas plantas têm sido descritas como eficazes no combate ao diabetes e utilizadas empiricamente com os apelos antidiabético e anti-hiperlipidêmico. O mercado farmacêutico apresenta diversos medicamentos para combater o diabetes e suas complicações, porém ainda é considerado um problema de saúde pública (FEIJÓ *et al.*, 2012; JANEIRO *et al.*, 2008; MALVIYA *et al.*, 2010). O foco na alimentação e na saúde das populações dos países ocidentais tem provocado grande interesse na identificação de novos alimentos funcionais e ingredientes para prevenir doenças específicas.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais (2007), alimento funcional pode ser definido como “o alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica, mediante a comprovação da sua eficácia e segurança por meio de estudos científicos” (PEREIRA, 2014).

O Brasil é o país que apresenta a maior biodiversidade do mundo, e na América do sul há uma grande variedade de plantas com potencial funcional que são esquecidas ou pouco utilizadas (PEDRESCHI *et al.*, 2003), o que permite acesso a inúmeras espécies, muitas delas praticamente desconhecidas e por tal motivo, muito pouco exploradas comercialmente (MATTIETTO, 2005; FAO, 2013). Um exemplo disso é o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma fonte particularmente abundante de fruto-oligossacarídeos (FOS) que são considerados prebióticos por atuarem principalmente no intestino grosso provocando a multiplicação e a atividade da microbiota intestinal (bifidobactérias e lactobacilos), inibindo a proliferação de microrganismos patogênicos, favorecendo a defesa imunológica (PEDRESCHI *et al.*, 2003).

Há evidências de que os fruto-oligossacarídeos favoreçam a diminuição da concentração sérica de glicose e insulina pós-prandial aumentando a viscosidade do conteúdo de nutrientes no intestino delgado, o que retarda a liberação da glicose e a ligação da glicose com a fibra, diminuindo, assim, sua disponibilidade para absorção e inibição da ação da amilase sobre o amido. Além disso, estudos mostram que a inulina e FOS presentes no yacon são considerados bons agentes formadores de gel, o que influencia a absorção dos carboidratos retardando o esvaziamento gástrico e/ou diminuindo o tempo de trânsito no intestino delgado (CABRERA LLANO; CÁRDENAS FERRER, 2006; SAAD, 2006).

Além dos FOS, o yacon possui elevada quantidade de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido caféico (SIMONOVSKA *et al.*, 2003). Esses compostos estão relacionados com a prevenção de câncer, além de atividade antioxidante e insulino-trópica sobre células- β . O ácido clorogênico é bastante encontrado no yacon e vem sendo reportado por modular a atividade da glicose-6-fosfatase hepática, envolvendo o metabolismo da glicose (KARTHIKESAN; PARI; MENON, 2010; HEMMERLE *et al.*, 1997).

Outros compostos fenólicos, como os ácidos anacárdicos, que são encontrados no caju estão relacionados à proteção contra danos oxidativos e câncer, (HEMSHEKHAR *et al.*, 2012) além de estarem associados a propriedades anti-diabéticas, porém há poucos estudos que associam os mecanismos de ação a essas propriedades benéficas. Embora os compostos fenólicos promovam efeitos benéficos à saúde (WILLET, 2011), estes compostos são substratos para enzimas da classe das óxido-redutases. É importante ressaltar que, durante o descascamento, o yacon sofre rápido escurecimento, uma vez que essa raiz é rica em polifenoloxidase, enzima que catalisa a oxigenação de compostos fenólicos que, após polimerização, apresentam os típicos pigmentos marrons ou pretos, conhecidos da oxidação enzimática de vegetais (VALENTOVÁ; ULRICHOVÁ, 2003). Esse escurecimento prejudica a qualidade do produto pela manifestação de odores estranhos (“*off flavors*”), além de alterações indesejáveis na cor, sabor (PADILHA *et al.*, 2009; HAARD; CHISM, 2000; VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE, 2001). Desta forma, o processamento do yacon sem qualquer tipo de tratamento de inativação enzimática leva a um escurecimento, uma vez que a presença da enzima polifenoloxidase e de compostos fenólicos da torna o yacon suscetível à ação das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO).

Nesse contexto o objetivo geral desse trabalho foi o desenvolvimento de duas bebidas de frutas tropicais e extrato de yacon, com funcionalidade comprovada através de ensaios *in vivo*.

Para elaboração desta dissertação, o trabalho de pesquisa foi dividido em quatro capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica que aborda os principais pontos envolvidos no trabalho, com destaque para alimentos funcionais e legislação, a importância das frutas tropicais, o yacon como fonte de oligossacarídeos prebióticos, o controle do escurecimento enzimático através da inibição da enzima polifenoloxidase, os fruto-oligossacarídeos e compostos fenólicos no controle do diabetes, e o edulcorante natural estévia.

O segundo capítulo aborda o estudo da enzima polifenoloxidase quanto aos valores de pH de atividade e estabilidade, sua inativação pelo uso de ácido cítrico e ácido ascórbico, e o processamento para obtenção do extrato de yacon e sua incorporação em bebidas funcionais. Para isso, foi utilizado um planejamento estatístico do tipo DCCR (Delineamento Central Composto Rotacional), a fim de se determinar a concentração dos ácidos estudados e o tempo de imersão do yacon na solução ácida. Através dos resultados foi possível estabelecer um processo que viabilizou a obtenção de um extrato de yacon com inativação da enzima PPO e manutenção dos componentes funcionais, como os FOS.

O terceiro capítulo trata do desenvolvimento de bebidas prebióticas compostas por polpas de abacaxi, açaí, acerola, cajá, caju e camu-camu, adicionadas de extrato de yacon (obtido no capítulo anterior), do tratamento térmico aplicado a essas bebidas, das análises para caracterização e da seleção de duas formulações.

O quarto e último capítulo aborda através de estudo *in vivo* com ratos Wistar, os parâmetros nutricionais de ganho de peso, consumo da dieta e glicemia, atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) no fígado, e a quantificação de lactobacilos no material cecal dos animais tratados com as formulações desenvolvidas no terceiro capítulo desta dissertação. Desta forma, foi possível relacionar as bebidas prebióticas a efeitos benéficos na redução de glicemia, atividade antioxidante e favorecimento do desenvolvimento de microrganismos benéficos ao funcionamento do intestino humano.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Alimentos funcionais e legislação

A crescente preocupação em aumentar a expectativa de vida da população tem provocado avanços nos estudos que envolvem alimentos e seus efeitos no organismo humano, buscando melhorar a qualidade nutricional e de vida das pessoas. Apesar da ideia de que alimentos poderiam estar relacionados à prevenção e tratamento de doenças ter surgido há milênios, somente na década de 80 o termo “alimento funcional” foi empregado, que, de uma forma geral, consiste na incorporação de determinados ingredientes bioativos, os quais o alimento não contém naturalmente, ou contém em pequena quantidade (RAIZEL *et al.*, 2011; PALANCA *et al.*, 2006).

Nos últimos anos tem-se atribuído aos alimentos, além das finalidades de nutrir e ter apelo sensorial, uma terceira função, associada a respostas fisiológicas específicas provocadas por alguns alimentos, que são chamados de alimentos funcionais (ZERAİK *et al.*, 2010).

Dentre estes, destacam-se os prebióticos, componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, além de inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006).

Os alimentos com alegação de propriedades funcionais têm sido regulamentados no Brasil através das resoluções n° 16, 17, 18 e 19 de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999 a, b, c, d), resolução n° 23, de 15 de março de 2000 (BRASIL, 2000) e resolução RDC n° 2 de 2002 (BRASIL, 2002), publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tratando desde as diretrizes básicas para análise e comprovação destas propriedades até procedimentos para registro. Segundo Brasil (2002), a alegação de propriedade funcional é relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Neste contexto, dentre as 16 alegações aprovadas pela ANVISA, destacam-se os prebióticos, que devem estar contidos no alimento em quantidades mínimas (1,5 g /porção se o alimento for líquido, ou 3 g /porção se o alimento for sólido) para assegurar que o benefício ao hospedeiro seja alcançado com a ingestão do produto alimentício.

1.2 Sucos e frutas tropicais – fontes de antioxidantes naturais

A produção de sucos de frutas é considerada como uma das atividades mais promissoras na indústria alimentícia com grandes possibilidades de crescimento de mercado. Bebidas com novos sabores e aromas estão sendo elaboradas em todo o mundo, sendo as bebidas de frutas mais uma opção para os consumidores e uma tendência no mercado internacional (SOUSA, 2006).

Segundo Sousa (2006), apesar da grande variedade de frutas tropicais com sabores diferenciados apresentando grande potencial mercadológico, ainda são poucos os produtos comerciais de misturas de frutas tropicais. Esses produtos apresentam uma série de vantagens, como a combinação de diferentes aromas e sabores somados aos componentes nutricionais e funcionais.

No mercado de sucos e néctares industrializados, um novo segmento que está se expandindo é o de bebidas mistas de frutas (*blends*), que compõem uma boa fonte nutricional de algumas vitaminas, minerais e carboidratos solúveis, de forma que algumas frutas possuem teor mais elevado de um ou de outro nutriente, e com o desenvolvimento de “*blends*” ocorre uma compensação, produzindo sucos e néctares com alto valor nutritivo. Além disso, o desenvolvimento de bebidas mistas possibilita a obtenção de novos sabores, cores, texturas e o incremento de componentes nutricionais (MORZELLE *et al.*, 2010).

Dentre os compostos bioativos presentes em frutas tropicais, destaca-se a presença de compostos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis. Inúmeros estudos realizados com estes compostos demonstram a capacidade de sequestrar radicais livres (atividade antioxidante) e seus efeitos na prevenção de enfermidades cardiovasculares, circulatórias, no diabetes e no mal de Alzheimer (KUSKOSKI *et al.*, 2006). Além de compostos fenólicos, os carotenoides, assim como o ácido ascórbico (vitamina C), também apresentam capacidade antioxidante, que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres.

Diversos estudos apontam o açaí, o camu-camu e a acerola (RUFINO *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2009; ROSSO *et al.*, 2008) como frutas tropicais com elevada concentração de ácido ascórbico: 84 ± 10 mg /100 g (açaí); $1882 \pm 43,2$ mg /100 g (camu-camu); $1357 \pm 9,5$ mg /100 g (acerola) e compostos fenólicos: 3268 ± 527 mg GAE/100 g (açaí); $11,615 \pm 384$ mg GAE/100 g (camu-camu); $10,280 \pm 77,7$ mg GAE/100 g (acerola); e o cajá como rico em

carotenoides ($0,7 \pm 0,0$ mg /100g de polpa). Rufino *et al.* (2010) encontraram cerca de 190 mg /100 g de vitamina C no pedúnculo de caju. Desta forma, são frutas promissoras para a elaboração de bebidas mistas com apelo funcional, devido a sua elevada concentração de antioxidantes naturais.

O abacaxi destaca-se entre os sucos de frutas tropicais principalmente pelas suas características sensoriais (BORGES *et al.*, 2004).

1.2.1 Abacaxi

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merri) é uma espécie proveniente de regiões tropicais e subtropicais, sendo bastante apreciado em todo o mundo (GOMES *et al.*, 2009) devido às suas atraentes características sensoriais de sabor, acidez, doçura e cor e nutricionais: é fonte de vitamina C (47,8 g /100g), rico em manganês (0,927 mg/100g) e possui fibras (1,4 g/100g) que ajudam a regular o funcionamento intestinal e eliminar toxinas do organismo (MORAES, 2007; RAMALLO; MASCHERONI, 2012). O Brasil destaca-se por ser o maior produtor de abacaxi da América do Sul (GOMES *et al.*, 2009), em 2012 produziu 3.176.593 t de abacaxi, e é reconhecido mundialmente pela expansão da sua produção e pelo seu potencial de exportação (USDA, 2014; IBGE, 2013).

1.2.2 Açaí

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é um fruto típico da região amazônica que tem se destacado nos últimos anos por seus benefícios à saúde associados à sua composição fitoquímica e à capacidade antioxidante (PORTINHO *et al.*, 2012). É rico em antocianinas, podendo apresentar 111 mg /100 g de polpa (RUFINO *et al.*, 2010), que são responsáveis pela cor do fruto e possuem função antioxidante, com ação antimutagênica e anticarcinogênica, além de efeitos antibacteriano, antiviral, antiinflamatório, antialérgico, antitrombótico e vasodilatador (POMPEU *et al.*, 2009). É uma importante fonte de lipídios, proteínas, fibras, minerais (Mn, Cu, Cr, B) e vitaminas (SANTOS *et al.*, 2008).

1.2.3 Acerola

A acerola é uma fruta exótica que se destaca por ser uma abundante fonte de vitamina C, possuindo cerca de 1300 mg /100 g de polpa (CARPENTIERI-PÍPOLO *et al.*, 2000), ou seja, 100 vezes mais vitamina C que a laranja e o limão, 20 vezes mais que a goiaba e 10 vezes mais que o caju e a amora. Em virtude de tal característica, é conferido a essa fruta um imensurável valor farmacológico e alimentício, por sua importância como alimento e por consistir em uma alternativa de fonte de vitamina C a baixo custo. É bastante cultivada na região Nordeste, devido às condições de solo e clima favoráveis, sendo, portanto uma fruta de grande importância econômica para os Estados de Pernambuco, Ceará, Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte (SILVA; TASSARA, 2005).

1.2.4 Cajá

O cajá (*Spondias mombin L.*) é uma fruta cultivada no Nordeste do Brasil, especialmente no período chuvoso. É consumido principalmente *in natura* e na forma de polpa, dependendo da região do país. Apresenta alto valor nutricional devido à presença de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras, cálcio, ferro, fósforo, vitamina A, vitamina C [cerca de 26,50 mg /100 g de polpa, segundo Rufino *et al.* (2010)], tiamina, riboflavina, niacina e pigmentos carotenoides (0,7 mg /100 g de polpa) em sua composição, sendo este último de elevada importância, pois são pigmentos precursores da vitamina A (CARVALHO *et al.*, 2013; RUFINO *et al.*, 2010; REBOUÇAS NETO, 2007).

1.2.5 Caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta tropical, nativa do Brasil, dispersa em quase todo território brasileiro. A Região Nordeste é a principal responsável pela produção nacional, sendo os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí e Pará os principais produtores de caju em 2011 (ADECE, 2013).

O Ceará ocupou a 4º posição no ranking dos principais Estados produtores de frutas do Brasil em 2011, destacando-se como o Estado que mais produziu caju (ADECE, 2013).

O caju possui notável interesse nutricional e econômico. É bastante conhecido pela qualidade de sua castanha e pela riqueza em vitamina C, apresentando cerca de 190 mg /100 g de polpa (RUFINO *et al.*, 2010) de seu pedúnculo avolumado, o qual corresponde à polpa comestível (CARVALHO *et al.*, 2011).

Destaca-se dentre as diversas frutas tropicais que possuem potencial para aproveitamento agroindustrial na composição de bebidas funcionais, fabricação de doces, frutas secas e cristalizadas, sucos, bebidas destiladas e fermentadas (PAIVA *et al.*, 2000).

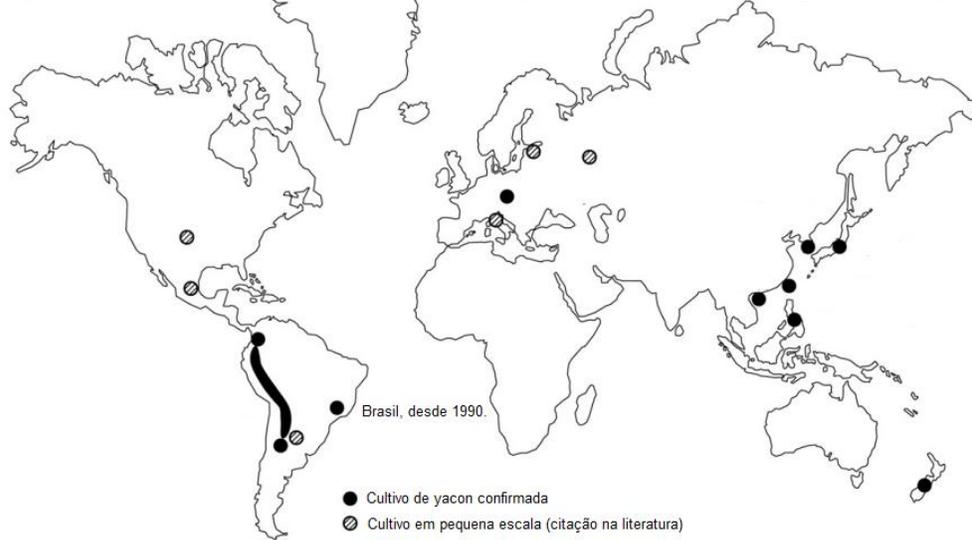
1.2.6 Camu-camu

O camu-camu é uma espécie nativa da Amazônia, tipicamente silvestre, com um alto potencial econômico capaz de torná-lo tão importantes quantas outras frutíferas da região, como o açaí e o cupuaçu. O fruto apresenta elevado valor nutritivo, em especial, possui uma altíssima concentração de ácido ascórbico, chegando a ter mais vitamina C (1882 mg /100 g de polpa) do que a acerola (SILVA; TASSARA, 2005; RUFINO *et al.*, 2010).

1.3 Yacon – fonte de oligossacarídeos prebióticos

O yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson] é uma planta de origem andina, comumente utilizado como alimento na América do Sul, sendo introduzida no Brasil na década de 90 (OJANSIVU *et al.*, 2011). A Figura 1 mostra que o cultivo do yacon ainda é mais presente na América do Sul, porém há registro de cultivo na Ásia e cultivos em pequena escala já relatados na literatura em outras regiões.

Figura 1 – Cultivo do yacon em diversas partes do mundo. Adaptado de Ojansivu *et al.* (2011)



O yacon possui sabor semelhante ao de frutas como melão, com polpa levemente amarelada, devido à presença de carotenoides, além de possuir textura crocante e aquosa. Tais características tornam versátil a utilização do yacon na alimentação, com fácil incorporação em bebidas. Apesar de o yacon ser comumente consumido *in natura*, diversos produtos têm sido desenvolvidos com o intuito de explorar as potencialidades desse alimento, devido, principalmente, apresentar elevadas concentrações de fruto-oligossacarídeos (FOS) (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O cultivo e consumo do yacon apresenta franca expansão devido a diversos fatores, como: práticas agrícolas (a planta é altamente adaptável a diversos climas e solos), econômico (exige poucos cuidados no plantio e possui alta produtividade) e sensorial (apresenta raiz suculenta, textura crocante e sabor levemente adocicado, semelhante ao da pera) (SANTANA; CARDOSO, 2008). Esse fato justifica os trabalhos desenvolvidos recentemente no Brasil com yacon, com destaque para: doce de goiaba vermelha e yacon (desidratados osmoticamente) e acerola (VENTURA, 2004), aplicação de farinha de yacon em produtos à base de cereais, como bolo inglês, biscoito tipo “chamurrada” e snacks à base de arroz (MARANGONI, 2007), farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate (MOSCATTO *et al.*, 2004), massa alimentícia a base de extrato em pó, farinha de yacon e farinha de arroz (GONÇALVES, 2010), bebida funcional de pêssago à base de yacon (SILVA, 2004) entre outros. No entanto, o foco destes trabalhos é apenas o desenvolvimento da tecnologia, e não a verificação de sua funcionalidade *in vivo*, fato este que compromete a aplicação e validação da tecnologia

gerada com foco em produtos que realmente tragam benefícios à saúde, pela ausência de dados que comprovem a sua eficiência e seu efeito benéfico no metabolismo humano (SILVA, 2004).

O Japão, considerado um dos pioneiros no uso desta raiz, vem desenvolvendo produtos de panificação, bebidas fermentadas, pó ou polpa liofilizada, picles entre outros (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A industrialização do yacon, na forma de bebida mista, sucos mistos ou néctares, é de fácil consumo podendo ser incorporado à dieta do diabético e da população em geral.

Além dos fatores socioeconômicos e sensoriais, outros fatores importantes para utilização de FOS com sucesso na indústria de alimentos se devem a propriedades tecnológicas como, resistência aos processos térmicos (pasteurização), são considerados isentos de calorias (1 a 1,5 Kcal/g), não são cariogênicos, não cristalizam, não precipitam e nem deixam sabor residual (MOLIS *et al.*, 1996; YUN, 1996).

Como citado anteriormente, o yacon vem sendo estudado como “alimento funcional” devido principalmente à sua elevada concentração de fruto-oligossacarídeos, que são encontrados naturalmente em diversas plantas, mas em concentrações menores se comparadas as da raiz de yacon (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Diferentemente da maioria das raízes que armazenam carboidratos na forma de amido, o yacon os armazena na forma de frutanos. Os órgãos subterrâneos do yacon contêm de 60 a 70% (em matéria seca) de frutanos do tipo inulina com grau de polimerização (GP) máximo de 12 (VILHENA *et al.*, 2000; ZARDINI, 1991).

Os frutanos do tipo inulina são oligo e polissacarídeos constituídos por uma molécula de sacarose, à qual se unem resíduos de frutose por ligações glicosídicas β (2→1), com estrutura baseada no composto 1-cestose (QUINTEROS, 2000). Dentro dos frutanos do tipo inulina estão dois grupos gerais de materiais, inulina e seus subconjuntos oligofrutose e fruto-oligossacarídeos (FOS) (CARABIN; FLAMM, 1999).

Os FOS são capazes de resistir à ação das enzimas hidrolíticas da saliva e da parte superior do trato gastrointestinal humano. Quando consumidos, chegam ao cólon sem alterações significativas em sua estrutura, pois ao chegarem ao intestino delgado se transformam em um gel, dificultando a absorção da glicose e reduzindo sua concentração sanguínea (COUDRAY *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Por esta razão, eles têm um baixo valor calórico. Os benefícios dos FOS estão relacionados a alívios de constipação, e redução dos níveis de lípidos e glicose em animais e indivíduos diabéticos. Os FOS do yacon são seletivamente

fermentados no cólon por bactérias benéficas que compõem parte da microbiota intestinal, especialmente as dos gêneros *Bifidus* e *Lactobacillus* (GENTA *et al.*, 2009), com produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como o acetato, propionato e butirato, além de ácido láctico, dióxido de carbono e hidrogênio (ROBERFROID, 1993; LUO *et al.*, 1996).

Frutanos do tipo inulina, a inulina e FOS têm sido estudados como oligossacarídeos prebióticos não digeríveis por modularem a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal favorecendo o crescimento de bactérias bifidogênicas, ao passo que reduzem a proliferação de microrganismos patógenos para o hospedeiro (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012).

Os fruto-oligossacarídeos presentes no yacon são apontados como eficientes na modulação da síndrome metabólica, fator de predisposição no desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2 e dislipidemias. Isso se deve à forma como tal carboidrato é absorvido, pois diferente da maioria dos carboidratos que são absorvidos na forma de glicose, os FOS, devido à presença das ligações β (2 \rightarrow 1) e à ausência de enzimas capazes de quebrar essas ligações em humanos, resistem à hidrólise das enzimas digestivas sendo fermentados no cólon até produzir ácidos graxos de cadeia curta que não elevam a concentração de glicose no sangue (GRAEFE *et al.*, 2004; VALENTOVÁ *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

O consumo de FOS também pode elevar a absorção de minerais como magnésio, fósforo e cálcio e, conseqüentemente, promovem a mineralização óssea. São capazes também de reduzir a inflamação decorrente da deficiência de magnésio, além de auxiliar na redução da pressão arterial em indivíduos hipertensos. Isso ocorre devido a sua forma de absorção que reduz a demanda de insulina evitando, dessa maneira, a hiperinsulinemia que, quando presente, ativa o sistema nervoso autônomo e age no hipotálamo aumentando sua atividade. Este fato prejudica a elasticidade vascular e eleva a absorção renal de sódio, o que contribui para a hipertensão (PASSOS; PARK, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

1.4 Fruto-oligossacarídeos e compostos fenólicos no controle do diabetes

1.4.1. Fruto-oligossacarídeos (FOS)

Os efeitos fisiológicos das fibras na dieta, bem como de suas propriedades físicas inerentes ao alimento, têm sido foco de atenção na prevenção do diabetes *mellitus* tipo 2. O diabetes *mellitus* pode ser definido como uma desordem metabólica de múltiplas etiologias, caracterizada por um estado de hiperglicemia crônica com consequentes alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, os quais resultam de defeitos na secreção e, em geral, na ação da insulina (MELLO; LAAKSONEN, 2009).

Os FOS podem ser usados de forma segura por indivíduos diabéticos por serem menos calóricos que a sacarose e fornecerem de 30% - 50% da doçura da sacarose. Eles têm solubilidade maior que a sacarose, não cristalizam, não precipitam, nem deixam sensação de boca seca ou areia na boca. Os FOS não são degradados durante a maioria dos processos de aquecimento, mas podem ser hidrolisados em frutose em condições muito ácidas e em condições de exposição prolongada de determinados binômios tempo/temperatura (PASSOS; PARK, 2003).

O diabetes está se tornando a epidemia do século e já afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. Até 2025, a previsão é que existirão aproximadamente 380 milhões de indivíduos diabéticos, valor este que é impulsionado pelo estilo de vida sedentário, o consumo de dietas de alto conteúdo energético, a obesidade e os fatores genéticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). No Brasil, de acordo com o Vigitel (2011) (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,6%, o que representa cerca de 10.779.06 de pessoas que confirmaram ser portadoras da doença. Porém, a prevalência aumenta com a idade, chegando a atingir cerca de 21,6% da população com idade superior a 65 anos.

A doença é caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea (126 mg/dL em glicose de jejum), resultantes da deficiência na secreção e/ou ação da insulina, o que leva a anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, com complicações agudas e crônicas, como a cetoacidose, coma, macro e microangiopatia, retinopatia, nefropatia, neuropatia, infecções recorrentes, úlceras nas extremidades inferiores e amputações. A hiperglicemia é marcada pela poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008; SACKS *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2006). Estas

complicações são as principais causas de mortalidade em pacientes diabéticos e estão associadas à hiperglicemia e à formação de proteínas glicadas (JENKINS *et al.*, 2002).

Para redução dos fatores de risco para o diabetes, a ingestão de fibras alimentares pode ser uma alternativa (LAIRON *et al.*, 2005). Estudos experimentais têm examinado os efeitos fisiológicos de vários tipos de fibras e os efeitos relatados variam desde a modulação da morfologia e função gastrointestinal até alterações no metabolismo de nutrientes e aumento das respostas imunológicas. Alguns destes efeitos resultam das ações mecânicas das fibras no trato gastrointestinal, outros derivam da interação das fibras com a água, minerais e compostos orgânicos no quimo intestinal. Muitos efeitos adicionais são consequência da fermentação dessas fibras no cólon por bifidobactérias e lactobacilos, que influenciam na ecologia intestinal e geram produtos finais fisiologicamente ativos (AACC, 2001), como os ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato, lactato, succinato, piruvato, entre outros), que aumentam a tolerância à glicose na refeição posterior (GENTA *et al.*, 2009). A fermentação da inulina e dos fruto-oligossarídeos produz altos níveis de ácido lático, o que reduz expressivamente, o pH do cólon (DE SCHRIJVER, 1996; ROBERFROID, 1993), desfavorecendo o crescimento de microrganismos patógenos.

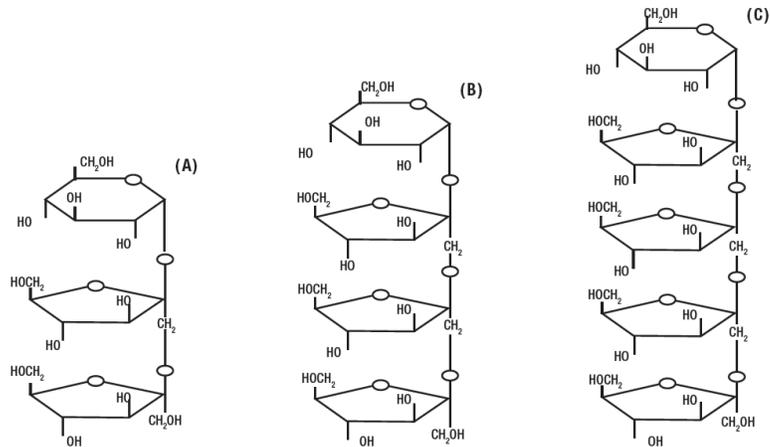
Baseado em evidências epidemiológicas, certos tipo de fibras alimentares têm demonstrado serem capazes de aumentar o bolo fecal, a motilidade gastrointestinal e a saciedade, impedir o desenvolvimento do diabetes *mellitus* bem como reduzir valores de glicemia e insulinemia pós-prandial (SILVA *et al.*, 2003), e em consequência, a resposta insulínica. Melhoram também a tolerância à glicose e o perfil lipídico (LOCK *et al.*, 2005), o que favorece o controle do diabetes por meio do controle do peso corporal, reduzindo o risco de complicações da doença (LIU *et al.*, 2003).

O uso medicinal da yacon tem aumentado devido à propriedade hipoglicemiante relatada nesta planta (CORRÊA *et al.*, 2009), relacionada ao FOS. Além desta propriedade, têm sido relacionados outros efeitos benéficos da raiz na saúde humana, que seriam a não-cariogenicidade, o reduzido valor energético, a redução de lipídios no sangue, o aumento da absorção de minerais como cálcio, magnésio e ferro e a inibição dos estágios iniciais do câncer de colón (QUINTEROS, 2000; VANINI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2004).

Na literatura podem ser encontrados estudos que demonstram o efeito hipoglicemiante dos fruto-oligossacarídeos do yacon em ratos induzidos ao diabetes (OLIVEIRA *et al.*, 2009) no

envolvimento no controle do índice glicêmico em jovens universitários (TEIXEIRA *et al.*, 2009), e em mulheres saudáveis (SILVA *et al.*, 2006).

Figura 2 – Estrutura química dos principais frutooligosacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C). Fonte: Fortes & Muniz (2009).



1.4.2. Compostos fenólicos

Estudos mostram que os antioxidantes oriundos de alimentos podem estar relacionados com a prevenção de diversas patologias, incluindo diferentes tipos de câncer, doenças cardiovasculares e neurológicas, e doenças relacionadas com o envelhecimento (WILLET, 2011). Além de possuir vitaminas A, C e E, os alimentos de origem vegetal também apresentam em sua composição carotenoides e compostos fenólicos, como os flavonóides. (TABART *et al.*, 2009). Os fitoquímicos estão relacionados com a prevenção de câncer, doenças cardíacas, diabetes e alta pressão sanguínea, além de atividade antioxidante e insulínica sobre células- β (CRAIG, 1999; KARTHIKESAN; PARI; MENON, 2010). O ácido clorogênico é um composto fenólico bastante encontrado em vegetais (MATTILA; KUMPULAINEN, 2002), como o yacon, que vem sendo reportado por modular a atividade da glicose-6-fosfatase hepática, envolvendo o metabolismo da glicose (HEMMERLE *et al.*, 1997).

Os efeitos antidiabéticos do extrato da raiz yacon em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) foram atribuídos à sua atividade antioxidante e compostos fenólicos, como o ácido clorogênico (PARK *et al.*, 2009). Genta *et al.* (2009) relataram que a ingestão diária de xarope de yacon pode auxiliar na redução de peso corporal, circunferência da cintura e no índice de massa corporal, sugerindo que o yacon é uma alternativa para o tratamento da

obesidade. Além disso, foram relatados efeitos benéficos sobre a resistência à insulina e os níveis de LDL-colesterol sérico, sugerindo um efeito na síndrome metabólica e diabetes, sendo a maioria dos efeitos benéficos do consumo de yacon atribuídos ao conteúdo de compostos fenólicos, antioxidantes e prebióticos (FOS). (CAMPOS *et al.*, 2012).

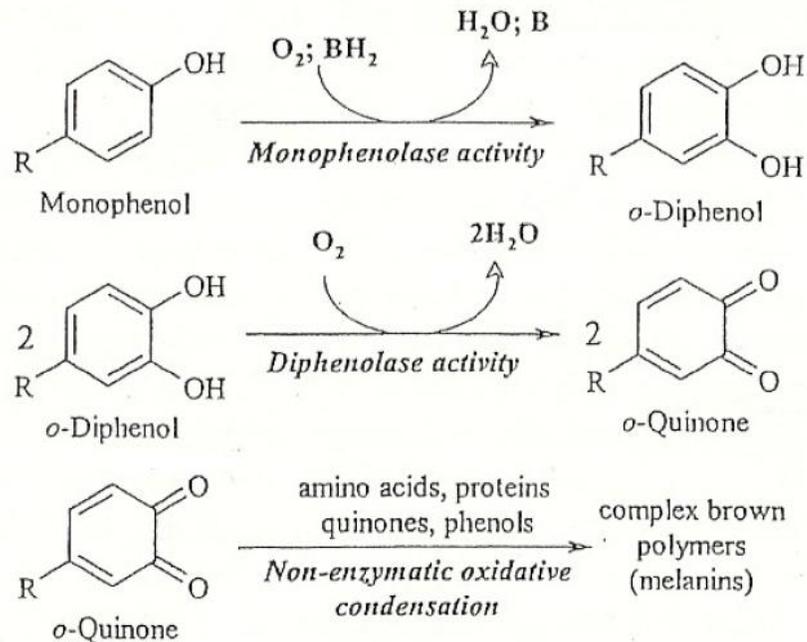
Os ácidos anacárdicos também são classificados como compostos fenólicos. São encontrados no caju e possuem valor medicinal relacionado à proteção contra danos oxidativos e câncer. (HEMSHEKHAR *et al.*, 2012). Esses compostos também estão associados a propriedades anti-diabéticas, sendo associados a efeitos sobre a captação de glicose nas células do músculo esquelético, possivelmente através da ativação da adenosina-monofosfato de proteína quinase – AMPK (TEDONG *et al.*, 2010; ARION *et al.*, 1998), porém há poucos estudos que associam os mecanismos de ação a essas propriedades benéficas. Brito *et al.*, 2007 e Trevisan *et al.*, 2006) mostraram que polifenóis e flavonóides têm ação antioxidante, e Salam *et al.*, (2008) mostrou que alguns flavonóides isolados a partir de plantas podem atuar como agentes anti-diabéticos pela ação seletiva nos receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo gama (PPAR- γ), um receptor nuclear que desempenha um papel essencial na resistência à insulina e síndrome metabólica (ABDULLAHI; OLATUNJI, 2010).

1.5 Tratamento ácido para inibição da polifenoloxidase do yacon

O escurecimento enzimático está associado à ação das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), que utilizam compostos fenólicos como substratos e podem promover alterações indesejáveis na cor, sabor e aroma dos vegetais (VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE, 2001).

O yacon contém quantidades consideráveis da enzima polifenoloxidase, a qual catalisa a oxigenação de compostos fenólicos a quinonas, que após polimerização apresentam pigmentos marrons ou pretos, caracterizando a oxidação enzimática de frutas e hortaliças (escurecimento enzimático). A figura 3 ilustra as reações catalisadas pela PPO envolvidas no escurecimento enzimático.

Figura 3 – Reações catalisadas pela PPO e formação de compostos escuros (melaninas). Adaptado de Santos (2009).



Durante as etapas de corte e descascamento no processamento do yacon, as membranas das células são rompidas e os polifenóis e taninos tornam-se disponíveis para reagir com outros componentes celulares, o que pode provocar essa oxidação enzimática, tornando a superfície recém-cortada rapidamente escura quando exposta ao ar, causando danos à sua aparência e a de seus produtos (CHISARI; BARBAGALLO; SPAGNA, 2007; MDLULI, 2005; VALENTOVÁ; ULRICHOVÁ, 2003).

O controle do escurecimento enzimático torna-se necessário nessas etapas do processamento e é geralmente limitado à inibição da enzima, pois inativando as enzimas polifenoloxidase e peroxidase, responsáveis pela reação de escurecimento, (CABELLO, 2005) evita-se a oxidação dos fenólicos. Dentre os métodos propostos para a prevenção da oxidação, estão: a desidratação, o armazenamento a baixas temperaturas, o tratamento térmico, a eliminação do oxigênio do meio, a retirada de oxigênio do meio com controle de luminosidade utilizando embalagens adequadas, a utilização de antioxidantes como bissulfito de sódio, ácido ascórbico, ácido cítrico, butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), tocoferóis e EDTA, entre outros, (LUPETTI *et al.*, 2005; OZOGLU; BAYINDIRLI, 2002) sendo, entre os métodos de inativação enzimática, um dos mais indicados e utilizados, o tratamento térmico.

Contudo, Vendrell-Pascuas, Castellote-Bargallo, Lopez-Sabater (2000) mencionam que a inulina pura é praticamente insolúvel em água fria, mas facilmente solúvel em água quente. Assim, o tratamento do yacon com elevadas temperaturas torna-se inviável, pois acarretaria na perda dos constituintes funcionais do yacon, diminuindo o seu potencial como ingrediente funcional, enquanto que a utilização de ácidos orgânicos é um método viável, sendo a concentração do ácido (pH da solução de imersão) e o tempo de imersão dois pontos críticos a serem controlados para evitar a perda de fruto-oligosacarídeos por hidrólise ácida.

1.6 Estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

A estévia é um edulcorante natural que possui sabor doce, seguido de um sabor amargo residual (*aftertaste*), porém, dentre os edulcorantes naturais se destaca por possuir poder adoçante cerca de 150 a 300 vezes maior do que o da sacarose, e pela sua estabilidade frente ao calor e a uma ampla faixa de pH, características que propiciam sua aplicação na indústria alimentícia (GOTO; CLEMENTE, 1998; PARPINELLO *et al.*, 2001).

Além dessas vantagens, a estévia não é calórica, possui ação anticariogênica, e não é metabolizada pelo organismo humano, o que torna esse edulcorante interessante do ponto de vista alimentar, pois pode ser utilizado por pessoas diabéticas e obesas (REZENDE *et al.*, 2004; GEUNS, 2003).

Estudos mostram que a estévia é capaz de regular a deficiência insulínica em ratos (CHEN *et al.*, 2005) e pode reduzir a glicose no sangue em pacientes com diabetes tipo 2, indicando efeitos benéficos no metabolismo da glicose (GREGERSEN *et al.*, 2004). Jeppesen *et al.* (2002) tratou ratos diabéticos Goto-Kakizaki e Wistar com estévia e afirmou que este edulcorante possui ação anti-hiperglicêmica e insulínica, sendo uma terapia promissora no tratamento da diabetes tipo 2.

REFERÊNCIAS

- AACC REPORT. The definition of Dietary Fiber. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p.112-126, 2001.
- ABDULLAHI, S.; OLATUNJI, G. A. Antidiabetic activity of anacardium occidentale in alloxan-diabetic rats. **Journal of Science and Technology (Ghana)**, v. 30, n. 3, p. 35-41, 2010.
- ADECE- Agência de desenvolvimento do Ceará. **Perfil da produção de frutas Brasil Ceará 2013**. Disponível em: http://www.adece.ce.gov.br/phocadownload/Agronegocio/perfil_da_producao_de_frutas_brasil_ceara_2013_frutal.pdf Acesso em 12/11/2013.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus*. **Diabetes Care**, v. 33, S. 1, p. 62-69, 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus*. **Diabetes Care**, , v. 31, S. 1, p. 55-60, 2008.
- ARION, W.; CANFIELD, W., RAMOS, F.; SU, M.; BURGER, H.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P.; HERLING, A. Chlorogenic acid analogue S 3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 351, n. 2, p. 279-285, 1998.
- BORGES, C. D.; CHIM, J. F.; LEITÃO, A. M.; PEREIRA, E.; LUVIELMO, M. D. M. Produção de suco de abacaxi obtido a partir dos resíduos da indústria conserveira. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 2004.
- BRASIL. Resolução nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde, 2002.
- BRASIL. Resolução nº 23, de 15 de março de 2000 - Regulamento técnico sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos, 2000.
- BRASIL. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999 - Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes, 1999a.
- BRASIL. Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999 - Diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos, 1999b.
- BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 - Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, 1999c.
- BRASIL. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999 - Regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem, 1999d.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; LIN, L. Z.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118, 2007.

CABELLO, C. Extração e pré-tratamento químico de frutanos de yacon, *Polymnia sonchifolia*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 202-207, 2005.

CABRERA LLANO, J. L.; CÁRDENAS FERRER, M. Importancia de la fibra dietética para la nutrición humana. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v. 22, n. 4, 2006.

CAMPOS, D.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; CHIRINOS, R.; AGUILAR-GALVEZ, A.; NORATTO, G.; PEDRESCHI, R. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1592-1599, 2012.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 268-282, 1999.

CARPENTIERI-PIPOLO, V.; DESTRO, D.; PRETE, C. E. C.; GONZALES, M. G. N.; POPPER, I.; ZANATTA, S.; SILVA, F. A. M. Seleção de genótipos parentais de acerola com base na divergência genética multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p.1613-1619, 2000.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; FONSECA, A. V. V.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S. Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) tropical juice. **Journal of Food Science and Technology**, DOI 10.1007/s13197-013-1100-1, 2013.

CARVALHO, R. L.; MIRANDA, M. R.; BRASIL, I. M. Avaliação da qualidade, fitoquímicos e atividade antioxidante do suco tropical de caju. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2011.

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, 187-191, 2012.

CHEN, T. H.; CHEN, S. C.; CHAN, P.; CHU, Y. L.; YANG, H. Y.; CHENG, J. T. Mechanism of the hypoglycemic effects of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Planta Medica**, v. 71, n. 2, p. 108-113, 2005.

CHISARI, M.; BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3469-3476, 2007.

CORRÊA, C. M.; OLIVEIRA, G. N. D.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Plant regeneration through somatic embryogenesis of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (poepp. and endl.) H. Robinson]. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 549-554, 2009.

- COSTA, J. S. D.; OLINTO, M. T. A.; ASSUNÇÃO, M. C. S.; GIGANTE, D. P.; MACEDO, S.; MENEZES, A. M. B. Prevalência de Diabetes *Mellitus* em Pelotas, RS: um estudo de base populacional. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 542-5, 2006.
- COUDRAY, C. FEILLET-COUDRAY, C.; GUEUX, E.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y. Dietary inulin intake and age can affect intestinal absorption of zinc and copper in rats. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 117-122, 2006.
- CRAIG, W. J. Health-promoting properties of common herbs. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 3, p. 491-499, 1999.
- DE SCHRIJVER, R.; VANHOOF, K.; VANDE GINSTE, J. Effect of enzyme resistant starch on large bowel fermentation in rats and pigs. **Nutrition Research**, v. 19, n. 6, p. 927-936, 1999.
- FAO Statistical yearbook 2013 – World and food agriculture. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>. Acesso em: 20/12/2013.
- FEIJÓ, A. M.; BUENO, M. E. N.; CEOLIN, T.; LINCK, C. L.; SCHWARTZ, E.; LANGE, C.; MEINCKE, S. M. K.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de Diabetes *mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 50-56, 2012.
- FERNÁNDEZ, E.; RAJCHL, A.; LACHMAN, J.; CÍZKOVÁ, H.; KVASNICKA, F.; KOTÍKOVÁ, Z.; MILELLA, L.; VOLDRICH, M.. Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short-and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots. **LWT-Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 80-86, 2013.
- FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com fructooligosacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 20, n. 3, p. 241–252, 2009.
- GENTA, S.; CABRERA, W.; HABIB, N.; PONS, J.; CARILLO, I. M.; GRAU, A.; SÁNCHEZ, S. Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 182-187, 2009.
- GEUNS, J. M. C. Stevioside. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 913-921, 2003.
- GOMES, E.; PINTO, K.; SOUZA, A.; SOUZA, E.; LEITE, R.; NASCIMENTO, L.; MENDONÇA, R. Incidência de fusariose em frutos de abacaxi ‘Gold’. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 6, n. 3, p. 755-759, 2009.
- GONÇALVES, P. V. M. **Desenvolvimento de massa alimentícia funcional a base de extrato em pó e farinha de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e farinha de arroz por processo de extrusão termoplástica**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do Rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do Esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 3-6, 1998.

GRAEFE, S.; HERMANN, M.; MANRIQUE, I.; GOLOMBEK, S.; BUERKERT, A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**, v. 86, n. 2, p. 157-165, 2004. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 202-207, 2004.

GREGERSEN, S.; JEPPESEN, P. B.; HOLST, J. J.; HERMANSEN, K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, v.53, n. 1, p. 73-76, 2004.

HAARD, N. F.; CHISM, G. W. Características de los tejidos vegetales comestibles. FENNEMA, OR. **Química de los Alimentos**, v. 2, p. 1118-1199, 2000.

HEMMERLE, H.; BURGER, H.; BELOW, P.; SCHUBERT, G.; RIPPEL, R.; SCHINDLER, P. W.; PAULUS, E.; HERLING, A. W. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 137-145, 1997.

HEMSHEKHAR, M.; SEBASTIN SANTHOSH, M.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**, v. 26, n.1 p. 1-83, 2013.

JANEBRO, D. I.; QUEIROZ, M. D. S. R. D.; RAMOS, A. T.; SABAA-SRUR, A. U.; CUNHA, M. A. L. D.; DINIZ, M. F. F. M.. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 724-732, 2008.

JENKINS, D. J.; KENDALL C. W.C.; FAULKNER D.; VIDGEN E.; TRAUTWEIN, E. A.; PARKER, T. L.; MARCHIE, A.; KOUMBRIDIS, G.; LAPSLEY, K. G.; JOSSE, R. G.; LEITER, L. A.; CONNELLY, P. W. A dietary portfolio approach to cholesterol reduction: combined effects of plant sterols, vegetable proteins, and viscous fibers in hypercholesterolemia. **Metabolism**, v. 51, n. 12, p. 1596–1604, 2002.

JEPPESEN, P. B.; GREGERSEN, S.; ALSTRUP, K. K.; HERMANSEN, K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo* studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. **Phytomedicine**, v. 9, n. 1, p. 9-14, 2002.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V. P. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. **Chemico-biological interactions**, v. 188, n. 3, p. 643-650, 2010.

- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.
- LAIRON, D.; ARNAULT, N.; BERTRAI, S.; PLANELL, R.; CLERO, E.; HERCBERG, S.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in french adults. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 82, n. 6, p. 1185-1194, 2005.
- LIU, S.; WILLETT, W. C.; MANSON, J. E.; HU, F. B.; ROSNER, B.; COLDITZ, G. Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. **American Journal Clinical Nutrition**, v.78, n.5, p. 920-927, 2003.
- LOCK, K.; POMERLEAU, J.; CAUSER, L.; ALTMANN, D. R.; MCKEE, M. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. **Bull World Health Organ**, v. 83, n. 2, p.100-108, 2005.
- LUO, J.; SALWA W. R.; CATHERINE A.; ABDELGHANI B.; ANNE B.; JEAN-LUC B.; ANNICK L.; FRANCOIS G.; BORNET, F. R.; GERARD S. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by health subjects decrease basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 939-945, 1996.
- LUPETTI, K. O.; CARVALHO, L. C. D.; MOURA, A. F. D.; FATIBELLO-FILHO, O. Análise de imagem em química analítica: empregando metodologias simples e didáticas para entender e prevenir o escurecimento de tecidos vegetais. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 548-554, 2005.
- MALVIYA, N.; JAIN, S.; MALVIYA, S. Antidiabetic potential of medicinal plants. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 67, n. 2, p. 113-118, 2010.
- MARANGONI, A. L. **Potencialidade de aplicação de farinha de yacon (*Polymnia sonchifolia*) em produtos à base de cereais**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- MATTIETTO, R. A. **Estudo tecnológico de um néctar misto de cajá (*Spondias Lutea L.*) e umbu (*Spondias tuberosa*, Arruda Câmara)**. 2005. 299 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3660-3667, 2002.
- MDLULI, K. M. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 311-323, 2005.

- MELLO, V. D.; LAAKSONEN, D. E. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 509-18, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, SVS. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, VIGITEL 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde – SUS. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1457. Acesso em: 20/03/2012.
- MOLIS, C.; FLOURIÉ, B.; OUARNE, F.; GAILING, M. F.; LARTIGUE, S., GUIBERT, A.; BORNET, F.; GALMICHE, J. P. Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in health humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 3, p. 324-328, 1996.
- MORAES, C. Frutas na mesa: abacaxi o ano todo. **Revista Frutas e Derivados**. IBRAF– Instituto Brasileiro de Frutas, Ano 2, Edição 5, 2007.
- MORZELLE, M. C.; SOUZA, E. C.; ASSUMPCAO, C. F.; FLORES, J. C. J.; OLIVEIRA, K. A. M. Agregação de valor a frutos de ata através do desenvolvimento de néctar misto de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) e ata (*Annona squamosa* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 389-393, 2010.
- MOSCATTO, J. A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; HAULY, M.C.O. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 634-640, 2004.
- OJANSIVU, I.; FERREIRA, C. L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 40–46, 2011.
- OLIVEIRA, L. A.; COSTA, T. M. B., OLIVEIRA, L. D., FERREIRA, J. F.; NAVARRO, A. M. Glycemic reply in diabetic rats receiving with yacon water solution. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 61-67, 2009.
- ÖZOĞLU, H.; BAYINDIRLI, A. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. **Food Control**, v. 13, n. 4, p. 213-221, 2002.
- PADILHA, V. M.; ROLIM, P. M.; SALGADO, S. M.; LIVERA, A. V. S.; OLIVEIRA, M. G. Tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2178-2184, 2009.
- PAIVA, F. F. A.; GARRUTI, D. S.; SILVA NETO, R. M. **Aproveitamento industrial do caju**. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Série Documentos, v. 38, 2000.
- PALANCA, V.; RODRÍGUEZ, E.; SEÑORÁNS, J.; REGLERO, G. Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. **Alimentos funcionales, Nutrición Hospitalaria**, v. 21, n. 2, p. 199-202, 2006.

PARK, J. S.; YANG, J. S.; HWANG, B. Y.; YOO, B. K.; HAN, K. Hypoglycemic effect of yacon tuber extract and its constituent, chlorogenic acid, in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 17, n. 3, p. 256-262, 2009.

PARPINELLO, G. P., VERSARI, A., Castellari, M.; GALASSI, S. Stevioside as a replacement of sucrose in peach juice: Sensory evaluation. **Journal of Sensory Studies**, v. 16, n. 5, p. 471-484, 2001.

PASSOS, L. M. L., PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5278-5284, 2003.

PEREIRA, A. C. S. **Desenvolvimento de sucos tropicais mistos com elevada capacidade antioxidante e avaliação *in vivo***. 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

POMPEU, D. R.; BARATA, V. C. P.; ROGEZ, H. Impacto da refrigeração sobre variáveis de qualidade dos frutos do açaizeiro (*Euterpe oleracea*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 141-148, 2009.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R.. Efeitos Benéficos do Açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 2012.

QUINTEROS, E. T. T. **Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de yacon**. 2000. 164 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; FILHO, A. D. R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RAMALLO, L. A.; MASCHERONI, R. H. Quality evaluation of pineapple fruit during drying process. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 275-283, 2012.

REBOUÇAS NETO, M. O. Qualidade de frutos de clones de cajazeira cultivados na Chapada do Apodi, Ceará. 2007. (Monografia em Agronomia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza: UFC, 50 f, 2007.

REIS, D. M.; PARDAL, D. P.; BALDISSERA, J. Estudo experimental sobre o uso do *Smallanthus sonchifolius* na redução da hiperglicemia: uma contribuição para a qualidade de vida e saúde dos diabéticos. **Revista Científica JOPEF**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2006.

- REZENDE, S. L.; BERGAMASCO, R.; MACHADO, N. R. C. F.; ANDRADE, C. M. G.; RIBEIRO, R. M.; URIO, H. Purificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni através dos processos com zeólitas e membranas. **Acta Scientiarum Technology**, v. 26, n. 1, p. 21-26, 2004.
- ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligofrutose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 103-148, 1993.
- ROSSO, V. V.; HILLEBRAND, S.; CUEVAS MONTILLA, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 291-299, 2008.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.
- RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A., ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 693-695, 2009.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SACKS, D. B.; BRUNS, D. E.; GOLDSTEIN, D. E.; MACLAREN, N. K.; MCDONALD, J. M.; PARROTT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes *mellitus*. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 436-472, 2002.
- SALAM, N. K.; HUANG, T. H. W.; KOTA, B. P.; KIM, M. S., LI, Y.; HIBBS, D. E. Novel PPAR-gamma Agonists Identified from a Natural Product Library: A Virtual Screening, Induced-Fit Docking and Biological Assay Study. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 71, n. 1, p. 57-70, 2008.
- SANTANA, I.; CARDOSO, M. H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 898-905, 2008.
- SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; PRADO, G. M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, n. 2, p. 187-192, 2008.
- SANTOS, I. R. C. **Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 120f., 2009.

- SILVA, A. S.; HAAS, P.; BEBER, R. C.; BATISTA, S. M. D. M.; ANTON, A. A.; FRANCISCO, A. D. Avaliação da resposta glicêmica em mulheres saudáveis após a ingestão de yacon (*Smallantus sonchifollius*) *in natura*, cultivadas no estado de Santa Catarina – Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 137-142, 2006.
- SILVA, E. B. **Processamento de bebida funcional à base de yacon (*Polymnia sonchifolia* Poepping & Endlicher)**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 96 f., 2004.
- SILVA, E.; CÁNDIDO, L.; SABINO, J.; FREITAS, R. S.; STERTZ, S. Composição química da raiz e das folhas desidratadas do yacon (*Polymnia sonchifolia* Poepp.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 48-52, 2004.
- SILVA, M. A. M.; BARCELOS, M. D. F. P.; SOUSA, R. V.; LIMA, H. M.; FALCO, I. R.; LIMA, A. L.; PEREIRA, M. C. D. A. Efeitos das fibras dos farelos de trigo e aveia sobre o perfil lipídico no sangue de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1321-1329, 2003.
- SILVA, S.; TASSARA, H.. **Frutas Brasil Frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 2005. 324 f.
- SIMONOVSKA, B; VOVK, I.; ANDRENŠEK, S.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, n. 1, p. 89-98, 2003.
- SOUSA, P. H. M. **Desenvolvimento de néctares mistos de frutas tropicais adicionados de *Ginkgo biloba* e *Panax ginseng***. 2006. 133p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1226-1233, 2009.
- TEDONG, L.; MADIRAJU, P.; MARTINEAU, L. C.; VALLERAND, D.; ARNASON, J. T.; DESIRE, D. D.; LAVOIE, L.; Kamtchouing, P.; Haddad, P. S. Hydro-ethanolic extract of cashew tree (*Anacardium occidentale*) nut and its principal compound, anacardic acid, stimulate glucose uptake in C2C12 muscle cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 12, p. 1753-1762, 2010.
- TEIXEIRA, A. P.; PAIVA, C.; RESENDE, A.; ZANDONADI, R. P. O efeito da adição de yacon no suco de laranja industrializado sob a curva glicêmica de estudantes universitários. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 313-319, 2009.
- TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale* L.) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

USDA, Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory Home Page. 2013. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl> Acesso em: 20/02/2014.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 321-325, 2001.

VALENTOVÁ, K.; STEJSKAL, D.; BARTEK, J.; DVOŘÁČKOVÁ, S.; KŘEN, V.; ULRICHOVÁ, J.; ŠIMÁNEK, V. Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: *In vivo* safety assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1006-1013, 2008.

VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* – prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers**, v.147, n.2, p.119-130, 2003.

VANINI, M.; BARBIERI, R. L.; CEOLIN, T.; HECK, R. M.; MESQUITA, M. K. A relação do tubérculo andino yacon com a saúde humana. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 8, p. 92-96, 2009.

VENDRELL-PASCUAS, S.; CASTELLOTE-BARGALLO, A. I.; LOPEZ-SABATER, M. C. Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1, p. 591-597, 2000.

VENTURA, F. C. **Desenvolvimento de doce de fruta em massa funcional de valor calórico reduzido, pela combinação de goiaba vermelha e yacon desidratados osmoticamente e acerola**. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 217 f, 2004.

VILHENA, S. M. C; CÂMARA, F. L.; KADIHARA, S. T. O cultivo do yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 5-8, 2000.

WILLETT, W. **Eat, drink, and be healthy: the Harvard Medical School guide to healthy eating**. Simon and Schuster: New York, 2011.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p.107-117, 1996.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes of yacon, *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 1, p. 72-85, 1991.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. MARACUJÁ: um alimento funcional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

CAPÍTULO 2: PROCESSAMENTO DO YACON COM MANUTENÇÃO DAS SUAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E INATIVAÇÃO DAS ENZIMAS DE ESCURECIMENTO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento das raízes de yacon com os ácidos cítrico e ascórbico, visando inativação da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), com mínima alteração nos teores de fruto-oligossacarídeos (FOS). Observou-se que o tratamento do yacon com os ácidos ascórbico e cítrico foi eficaz na inativação da enzima PPO, sendo as condições ótimas: concentração de ácido ascórbico de 4,6% com tempo de imersão de 2 minutos; ou concentração de ácido cítrico de 2,4% durante 9 minutos. Além disso, os tratamentos não diminuíram expressivamente os teores de FOS, tornando viável a inativação enzimática da PPO do yacon com ácido cítrico e ascórbico, nas concentrações e tempos determinados pelos resultados do planejamento experimental.

Palavras-chave: yacon, polifenoloxidase, escurecimento enzimático, ácido cítrico, ácido ascórbico, fruto-oligossacarídeos.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the effect of yacon roots treatment with two organic acids (citric and ascorbic acids), targeting inactivation of polyphenol oxidase (PPO) activity, with minimal change in fructo-oligosaccharides (FOS) levels. The yacon treatment with ascorbic and citric acids was effective in PPO inactivation and the optimal conditions were: the concentration range of 4.25 – 4.6% for ascorbic acid with soak time of 1 to 2 minutes; or citric acid concentration of 2.4 to 4% for 8.5 – 9 minutes. Furthermore, the treatments did not significantly decreased the FOS levels, making feasible the enzymatic inactivation of yacon PPO with citric acid and ascorbic acid at concentrations and times determined by the results of the experimental design.

Keywords: yacon, polyphenoloxidase enzymatic browning, citric acid, ascorbic acid, fructo-oligosaccharides.

2.1 INTRODUÇÃO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz nativa dos Andes, da família *Asteraceae*, cujo cultivo tem se expandido a outros países, inclusive o Brasil. O interesse nessa raiz é devido ao seu elevado teor de fruto-oligossacarídeos, que são capazes de estimular o desenvolvimento de bactérias benéficas no intestino humano, como bifidobactérias e lactobacilos (SANTANA; CARDOSO, 2008; GRAEFE *et al.*, 2004). O conteúdo de fruto-oligossacarídeos na raiz tuberosa é de aproximadamente 60-70% em base seca (PEDRESCHI *et al.*, 2003), sendo considerado como um dos alimentos com mais elevados teores destes componentes (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Além disso, o yacon apresenta características sensoriais apreciadas (sabor doce e textura crocante, semelhantes à pera e ao melão), com facilidade de incorporação em produtos alimentícios, principalmente bebidas. Devido a essa semelhança, nos mercados locais andinos o yacon é exposto junto às maçãs e outras frutas, em vez de serem dispostos junto às raízes e tubérculos (VALENTOVÁ; ULRICHOVÁ, 2003).

As raízes do yacon também contêm quantidades expressivas de compostos fenólicos (variando de 7,9 – 30,8 mg de CAE/g em matéria seca), com predominância do ácido clorogênico (CAMPOS *et al.*, 2012; LACHMAN *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 1999) e derivados do ácido caféico (TAKENAKA *et al.*, 2003). Estes compostos têm reconhecida importância para a saúde humana por atuarem como antioxidantes naturais, protegendo as membranas celulares contra danos oxidativos e suas consequências nas doenças cardiovasculares e no câncer. Portanto, deve-se evitar a oxidação dos compostos fenólicos no yacon para manter o valor funcional das raízes. Porém, devido ao seu elevado conteúdo de enzimas da classe das polifenolxidasas, após descasque e corte, a raiz de yacon se caracteriza por se deteriorar facilmente e pelo rápido escurecimento do suco e de seus tecidos (NEVES; SILVA, 2007) durante o processamento e/ou armazenamento (LACHMAN *et al.*, 2004).

A polifenoloxidase (PPO) é uma enzima que provoca escurecimento enzimático em vegetais e derivados, e é um dos maiores problemas que ocorrem durante o processamento de frutas e hortaliças (YEMENICIOGLU; CEMEROGLU, 2003). O escurecimento rápido da raiz é causado em presença da polifenoloxidase, substratos fenólicos e oxigênio, em que a PPO catalisa a oxidação dos compostos fenólicos a quinonas, as quais são rapidamente condensadas, formando

complexos pigmentos de coloração marrom, denominados de melaninas. Esse escurecimento ocorre de forma rápida e intensa, acarretando perdas econômicas consideráveis, além da diminuição do valor nutritivo, e alterações indesejáveis no sabor e na aparência (LUPETTI *et al*, 2005; ARAÚJO, 2008).

A utilização de métodos de inativação enzimática de baixo custo e que possibilitem a obtenção de extrato de yacon com apreciáveis características sensoriais e manutenção dos seus componentes funcionais (FOS) torna-se essencial para viabilizar a incorporação desse extrato em bebidas. O controle do escurecimento enzimático pode ser feito através de métodos físicos ou químicos de conservação de alimentos como, utilização de calor, sulfitos, ou adição de ácidos (ARAÚJO, 2008), aplicados sob banho de imersão, porém, a solubilidade dos FOS aumenta drasticamente com uso de temperaturas elevadas (SILVA, 1996), acarretando a perda desses componentes para a água do banho, que é descartada, e o uso do sulfito, por sua vez, tem sido alvo de muitas críticas, tornando sua aplicação cada vez mais limitada.

Foram reportados na literatura estudos do efeito da temperatura na inativação da PPO em vegetais, considerando temperaturas que variaram de 0 – 80 °C. Aydemir (2004), Ni Eidhin; Murphy; O'beirne (2006) e Rapeanu *et al.* (2006) verificaram que as temperaturas na faixa de 70 – 80 °C foram eficientes na redução da atividade da polifenoloxidase (tendo atividade residual variando de 10 – 20%), evidenciando que são necessárias altas temperaturas para a inibição satisfatória dessa enzima, indicando que o tratamento térmico não é o mais adequado quando se tem FOS na composição do produto, e quando há interesse na manutenção dos teores desses compostos. Isso ocorre porque, conforme mencionado anteriormente, os fruto-oligossacarídeos são açúcares solúveis em água, e sua solubilidade aumenta de acordo com o aumento da temperatura. Desta forma, a imersão deste material em água em temperaturas elevadas, necessárias para a inativação enzimática, ocasionaria uma migração destes compostos para a água, que seria então, descartada.

A utilização de ácidos orgânicos torna-se então uma etapa essencial para o processamento desta raiz, sendo o tempo e a concentração do ácido considerados pontos críticos, pois em concentrações muito elevadas (pH muito baixo) e por tempo muito prolongado podem ocorrer grandes perdas nos teores de FOS devido à hidrólise ácida desse carboidrato (PASSOS; PARK, 2003). Devido a este fato, é importante aliar condições de processamento ácido com uso de tempos relativamente curtos, porém que sejam eficientes para o controle do escurecimento

enzimático do yacon. A definição de condições de processamento podem ser melhor obtidas através de planejamento de experimental, baseado nos fundamentos estatísticos. Isso torna-se uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo e avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas (RODRIGUEZ; IEMMA, 2005).

Desta forma, avaliar o emprego de dois ácidos orgânicos (ácido ascórbico e ácido cítrico) para inibição do escurecimento enzimático do yacon consiste em uma etapa fundamental para garantir sua incorporação, sem alteração na qualidade do produto final, em diversos produtos alimentícios com apelo funcional, como as bebidas prebióticas, atendendo assim às necessidades de um mercado ávido por produtos inovadores e versáteis na área de alimentos funcionais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Matéria-prima

As raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) *in natura* foram adquiridas no comércio local de Fortaleza – CE.

2.2.2 Obtenção do extrato enzimático aquoso de yacon

Para obtenção do extrato de yacon, 100 g da raiz tuberosa foram descascadas e a porção comestível foi triturada em liquidificador doméstico por 60 segundos com adição de 100 mL de água destilada e, posteriormente, a mistura foi filtrada em papel Whatman n° 1. O conteúdo filtrado foi utilizado na determinação da atividade e caracterização enzimática da PPO em diferentes valores de pH.

2.2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da PPO no extrato foi determinada como descrito por Paz (2010) com modificações. Adicionou-se 0,1 mL do extrato enzimático aquoso de yacon a 2,9 mL de catecol 0,01 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0. Após 15 segundos da reação, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 420 nm, à temperatura de 25 °C. O tubo branco foi preparado com a mistura de 2,9 mL de catecol 0,01 M e 0,1 mL do tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0. Uma unidade de atividade da PPO foi definida como a quantidade da enzima que ocasiona o aumento de 0,001 na absorbância por minuto por mL de amostra, (OKTAY *et al.*, 1995) nas condições acima.

2.2.4 Efeito do pH na atividade da PPO do yacon

Utilizou-se os sistemas tampão acetato (pH 3,8 – 5,2), tampão fosfato (pH 5,6 – 7,8) e tampão bórax-hidróxido de sódio (pH 9,2 – 10,1), nos quais adicionou-se 2,0 mL extrato aquoso de yacon. Para a determinação da atividade enzimática em cada um dos ensaios, utilizou-se 0,1

mL de extrato adicionados de 2,9 mL de solução de catecol 0,01 mol/L. Em seguida, a atividade enzimática foi determinada por espectrofotômetro.

2.2.5 Efeito do pH na estabilidade da PPO do yacon

O efeito do pH na estabilidade da PPO foi determinado na faixa de pH 3,8 a 10,1. Foram utilizados os sistemas tamponantes citados no item 2.2.4. Utilizou-se 2,0 mL de extrato aquoso adicionados de 2,0 mL de soluções tampão de diferentes valores de pH, em seguida foram incubados por 18 horas a 5 °C. Após a incubação, a atividade residual da PPO foi determinada no pH ótimo de atividade da enzima, utilizando-se tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,2.

2.2.6 Planejamento experimental e definição das condições de inibição do escurecimento enzimático

Após conhecimento do pH de atividade ótima e de estabilidade da PPO do yacon, foi realizado um delineamento do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para inativação da atividade da enzima mediante adição de solução ácida (cítrico ou ascórbico). O delineamento estatístico ($2^2 + 2(2) + 3$ PC) considerou as variáveis “tempo de permanência na solução de ácido (ascórbico ou cítrico)” e “concentração da solução de ácido (ascórbico ou cítrico)” como variáveis independentes, totalizando 11 ensaios para cada ácido utilizado no estudo. Os valores da variável “tempo de permanência na solução ácida” variaram de 60 a 540 segundos, e da concentração de ácido, de 0,2 a 4,6%, considerando $\alpha = 1,41$, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Matriz do planejamento experimental completo (valores codificados e valores reais) dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico para inibição da atividade da PPO.

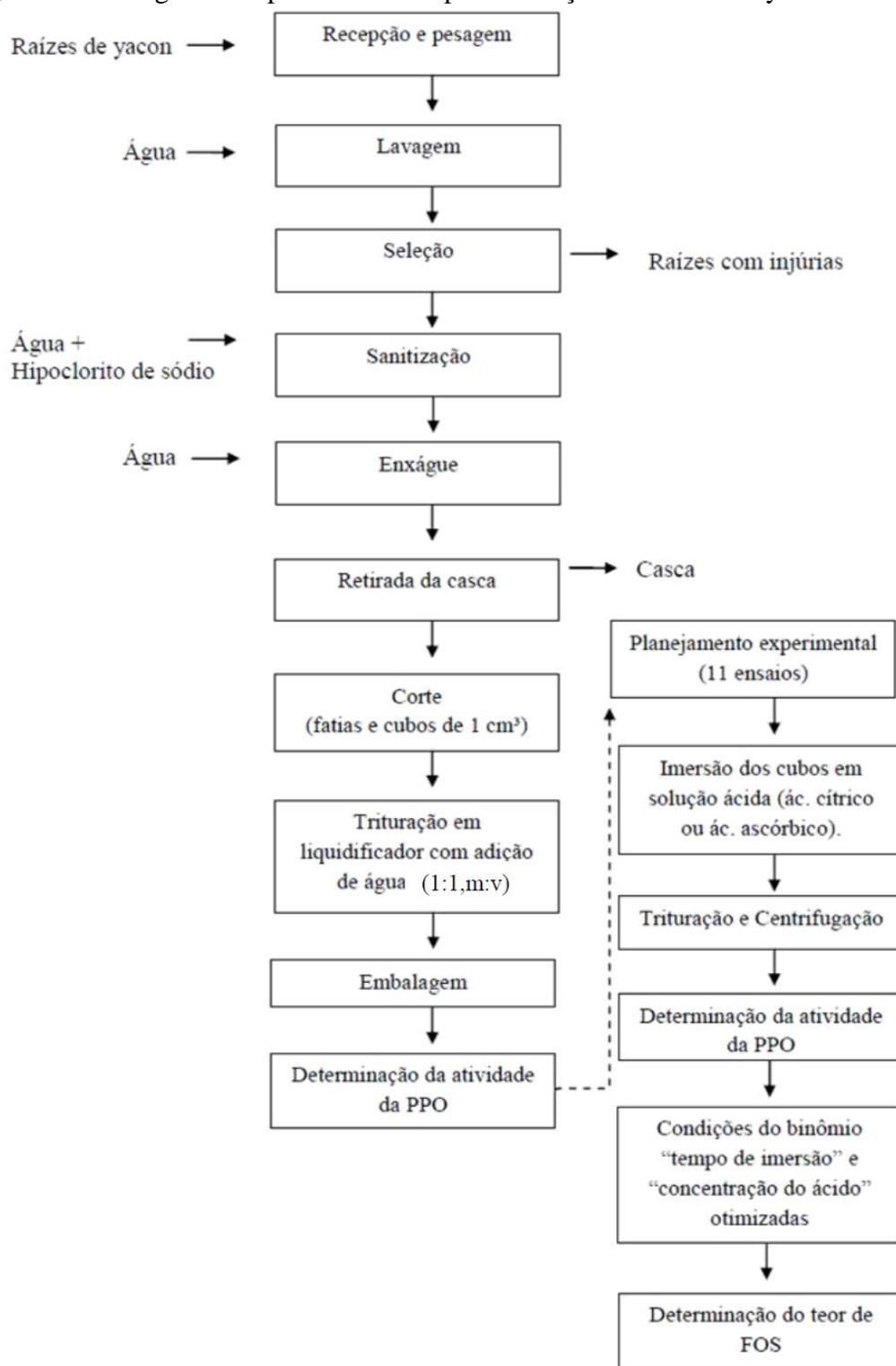
Ensaio	Ácido (%)	Tempo de solução (s)	Ácido (%)	Tempo de solução (s)
1	-1	-1	0,84	129
2	1	-1	3,96	129
3	-1	1	0,84	471
4	1	1	3,96	471
5	-1,41	0	0,20	300
6	1,41	0	4,60	300
7	0	-1,41	2,40	60
8	0	1,41	2,40	540
9	0	0	2,40	300
10	0	0	2,40	300
11	0	0	2,40	300

2.2.6.1. Preparo das amostras para o planejamento estatístico

Inicialmente, as raízes foram pesadas e limpas em água corrente para retirada das sujidades, e materiais estranhos. Em seguida, as raízes injuriadas e com doenças foram descartadas. Após a seleção, as raízes foram imersas por 15 minutos em tanque de aço inoxidável contendo água clorada (200 mg.L^{-1} de cloro ativo por litro de água) e enxaguadas em tanque de aço inoxidável contendo água limpa e tratada, para retirar o excesso de cloro. As raízes foram então descascadas utilizando-se um descascador de legumes manual e cortadas com facas de aço inoxidável em fatias de, aproximadamente, 1 cm de espessura. As etapas de descascamento e corte foram rápidas para evitar o escurecimento enzimático, que se inicia rapidamente após o descascamento. Em seguida, as fatias foram cortadas em cubos de aproximadamente 1 cm^3 usando um cortador de legumes apropriado de aço inoxidável. Os cubos de yacon foram imersos em soluções de ácido cítrico e ácido ascórbico em diferentes concentrações, e por diferentes tempos (de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1). Após o tratamento ácido, as amostras foram trituradas em liquidificador por 60 segundos, com adição de água na proporção 1:1 (m:v) e embaladas em recipientes plásticos. Após 2 horas do início do processamento, as amostras foram analisadas quanto à atividade da enzima polifenoloxidase, segundo metodologia descrita no item 2.2.3.

O fluxograma do processo para obtenção de extrato de yacon encontra-se na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de processamento para obtenção de extrato de yacon.



2.2.6.2. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do software Statistica versão 7.0, e os coeficientes de regressão e ANOVA foram determinados ($P < 0,05$).

2.2.7 Teor de fruto-oligossacarídeos

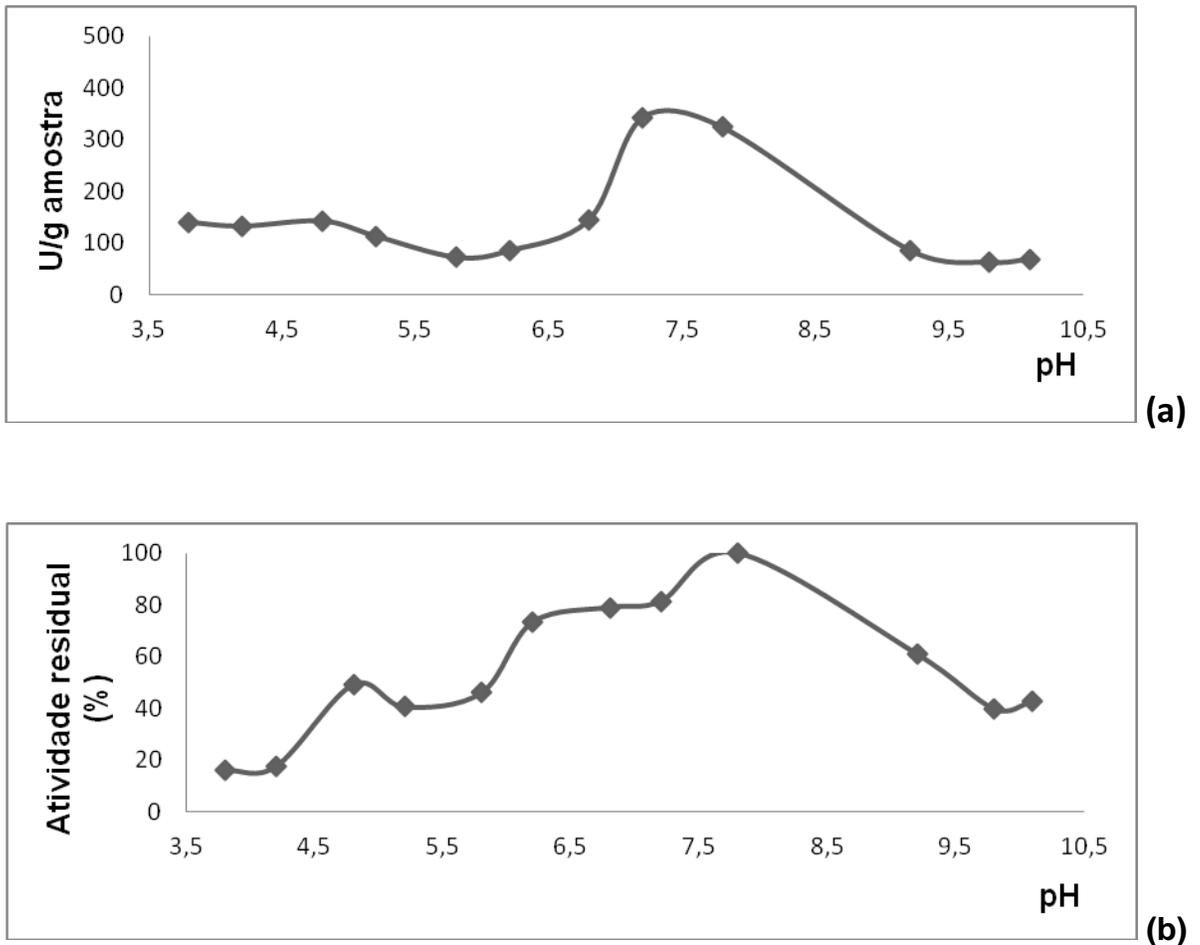
Após determinação das condições ótimas de processo utilizando ambos ácidos orgânicos, o yacon foi processado conforme metodologia descrita no item 2.2.6.1, porém sem adição de água, e o teor de FOS foi determinado através de metodologia descrita por Horwitz *et al.* (2010). Para verificar as perdas no processamento pelo uso dos ácidos, uma amostra sem adição de ácido foi também utilizada para esta análise.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima PPO do yacon

Para indicação de um tratamento apropriado para evitar a ação da PPO do yacon, foi necessário conhecer características da enzima. Desta forma, o pH de atividade e de estabilidade da enzima foram determinados, e os resultados podem ser visualizados na Figura 2.

Figura 2 – Faixa de pH ótimo de atividade (a); e pH de estabilidade (b) da enzima PPO do yacon após incubação por 18h a 5 °C



A PPO do yacon apresentou atividade ótima entre pH 7,2 e 7,8 (Figura 2a). Segundo Gawlik-Dziki (2008) a maioria das plantas, em geral, apresentam atividade máxima da PPO em pH neutro, ou próximo da neutralidade. Kavrayan; Aydemir (2001) em estudo com hortelã-pimenta encontram valor de pH ótimo de atividade da PPO 7,0 e Gomes *et al.* (2001), em trabalho realizado com extrato bruto de feijão, encontraram atividade ótima para a PPO em pH 7,2. Segundo Neves; Silva (2007), o pH ótimo da PPO varia de acordo com a fonte da enzima e depende também do substrato fenólico. Em batatas, Duangmal; Apenten (1999) relataram que a faixa ótima de pH de atividade da enzima é de 6,6 a 7,2, sendo a atividade reduzida para menos de 40% quando o pH encontra-se abaixo de 6,0. Rapeanu *et al.* (2006) obtiveram que a atividade máxima da PPO em extrato de uva ocorreu em pH 5,0, e que a faixa de pH ideal comum para a atividade da PPO em uva, bem como outros frutos, é na faixa de 5,0 – 7,0. Embora os resultados encontrados apresentem variações inerentes à matriz analisada, os resultados encontrados no presente trabalho mostram que os valores encontrados para atividade ótima da enzima PPO estão de acordo com a literatura.

Com relação a estabilidade da enzima, a Figura 2b ilustra que a PPO do yacon mostrou-se estável na faixa de pH de 6,2 a 9,2 (com declínio da atividade em pH 9,2), mantendo cerca de 50% ou mais da atividade inicial, após 17h a 25°C. A PPO do yacon mostrou menor estabilidade em pH inferior a 4,2. Resultado semelhante foi obtido por Kavrayan; Aydemir (2001), em estudo com hortelã-pimenta, em que a enzima ainda apresentou 20% de atividade em pH 4,0. Segundo Zemel *et al.* (1990), as PPOs são frequentemente inativadas a valores de pH abaixo de 4,0, fornecendo assim um método de controle do escurecimento enzimático. Rapeanu *et al.* (2006) obtiveram que em pH ácido (faixa de 2,5 – 4,0) a PPO da uva ainda apresentou atividade, pois em pH 3,5 a enzima apresentou 70% de atividade residual, e em pH alcalino (faixa de 7,0 – 9,0) a atividade da enzima diminuiu rapidamente, apresentando apenas 20% de atividade em pH 8.

Como já citado anteriormente, o tratamento do yacon é uma etapa fundamental no processamento da raiz, pois suas enzimas apresentam uma alta velocidade de reação, comprometendo a qualidade do produto pelo desenvolvimento de uma coloração escura intensa. O pH de atividade ótima da enzima obtido neste trabalho foi de 7,2, muito próximo ao pH da água. Desta forma, a obtenção do extrato de yacon sem qualquer tratamento predispõe o produto à ação das enzimas, tornando-se rapidamente inaceitável para consumo. Considerando o pH de

estabilidade da enzima (Figura 2b), o tratamento com ácidos pode ser uma estratégia viável, uma vez que a enzima apresenta menos de 20% de sua atividade inicial em pH inferiores a 4,2.

2.3.2 Tratamento do yacon visando inibição do escurecimento enzimático

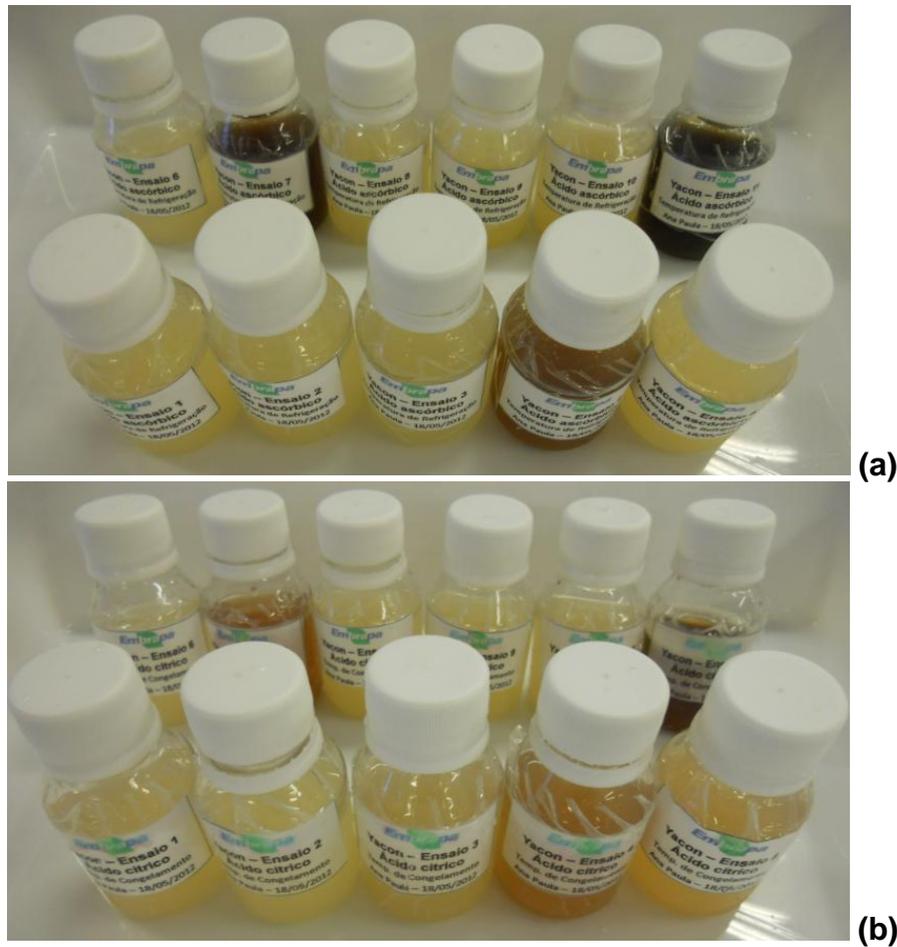
A atividade enzimática da PPO é bastante elevada principalmente em pH próximo a neutralidade (Figuras 2a e 2b). Desta forma, a obtenção do extrato de yacon para incorporação em diferentes produtos sem tratamento (ácido, térmico ou com sulfito, por exemplo), torna-se inviável devido ao rápido escurecimento do produto. Isso pode ser facilmente visualizado na Figura 3, que mostra a comparação entre o yacon processado sem nenhum tipo de tratamento prévio e, após tratamento com ácido cítrico.

Figura 3 – Extrato de yacon sem tratamento (a) e com tratamento com ácido cítrico (b), imediatamente após o processamento.



Para estabelecer as condições otimizadas de processamento, utilizando as variáveis tempo de imersão e concentração de ácido, um planejamento experimental foi realizado e a variável dependente foi a atividade residual da PPO. Através da Figura 4 é possível visualizar que alguns tratamentos utilizados no planejamento experimental não foram capazes de inibir a ação da enzima, tornando o produto inaceitável para incorporação em produtos alimentícios.

Figura 4 – Ensaio do planejamento experimental, utilizando ácido ascórbico (Figura a) e ácido cítrico (Figura b) para inibir a atividade enzimática da polifenoloxidase.



Os resultados da atividade enzimática para cada tratamento podem ser visualizados na Tabela 2, em que é possível visualizar o binômio estudado para os dois ácidos, bem como a atividade enzimática em cada tratamento.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental completo (valores codificados) dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico, com as respostas da atividade de polifenoloxidase.

Ensaio	Ácido (%)	Tempo em solução (min)	Atividade enzimática (U/g)	
			Tratamento com ácido cítrico	Tratamento com ácido ascórbico
1	-1	-1	61,5	104,7
2	1	-1	51,9	24,6
3	-1	1	65,3	67,1
4	1	1	42,6	14,3
5	-1,41	0	107,0	92,5
6	1,41	0	47,7	14,3
7	0	-1,41	46,7	38,2
8	0	1,41	42,4	34,0
9	0	0	47,0	40,3
10	0	0	47,4	34,4
11	0	0	47,8	38,3

Os resultados de atividade enzimática foram utilizados para determinação dos coeficientes de regressão (Tabela 3), e posteriormente, da ANOVA (Tabela 4).

Tabela 3 – Coeficientes de regressão para a resposta da atividade da enzima polifenoloxidase dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t (5)	P-valor	Limite de confiança -95%	Limite de confiança + 95%
Tratamento com ácido cítrico						
<i>Média</i>	47,41	5,14	9,22	<0,0001	34,20	60,62
<i>AC (L)</i>	-14,52	3,14	-4,61	0,005	-22,61	-6,42
<i>AC (Q)</i>	13,55	3,74	3,61	0,0152	3,92	23,18
<i>T (L)</i>	-1,45	3,14	-0,46	0,6630	-9,54	6,63
<i>T (Q)</i>	-2,83	3,74	-0,76	0,4841	-12,46	6,80
<i>AC x T</i>	-3,27	4,45	-0,74	0,4949	-14,71	8,16
Tratamento com ácido ascórbico						
<i>Média</i>	37,70	5,32	7,07	<0,0001	24,01	51,39
<i>AA (L)</i>	-30,42	3,25	-9,33	<0,0002	-38,81	-22,04
<i>AA (Q)</i>	9,84	3,88	2,53	0,0521	-0,13	19,82
<i>T (L)</i>	-6,71	3,26	-2,05	0,0944	-15,10	1,66
<i>T (Q)</i>	1,18	3,88	0,30	0,7727	-8,79	11,16
<i>AA x T</i>	6,82	4,61	1,47	0,198	-5,03	18,68

*Fatores em itálico foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$) para o processo.

*Considerando: AC = ácido cítrico (%), AA = ácido ascórbico (%) e T = tempo de imersão (minutos).

Tabela 4 – ANOVA para a atividade da PPO dos tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico.

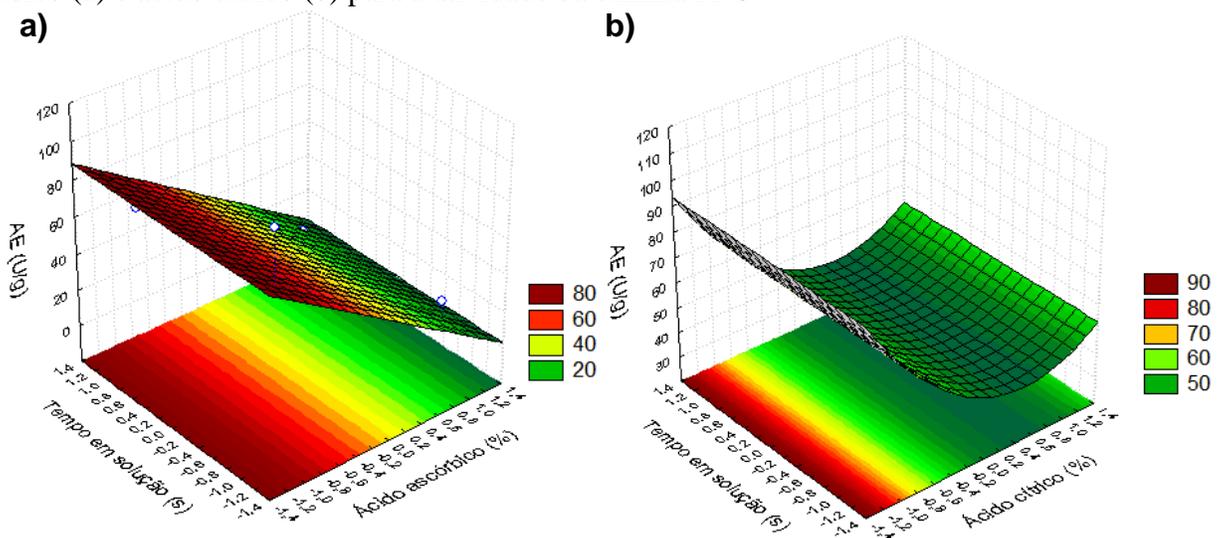
Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL*	Quadrados médios	F _{calc}	P-valor
Tratamento com ácido cítrico					
Regressão	2968,85	2	1484,43	23,71	< 0,0001
Resíduos	500,92	8	62,62		
Total	3469,77	10	346,97		
Tratamento com ácido ascórbico					
Regressão	7411,01	1	7411,01	43,31	< 0,0001
Resíduos	1540,06	9	171,12		
Total	8951,08	10	895,11		

*Considerando: $F_{2,8,0,05} = 4,46$ e $F_{1,9,0,05} = 5,12$; Variação explicada pelo modelo e $R^2 = 0,85$ e $R^2 = 0,83$, respectivamente.

*Considerando GL = Grau de Liberdade.

Através da análise das Tabelas 3 e 4 verifica-se que os termos linear e quadrático da variável ácido cítrico foram significativos para o processo ($P < 0,05$), e a variação explicada (R^2) pelo modelo foi de 0,85. Para o ácido ascórbico, somente o termo linear foi significativo ($P < 0,05$), com variação explicada pelo modelo, de 0,83. Os valores de F_{calc} . foram maiores que o F_{tab} . para ambos os tratamentos, indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo. Desta forma, os modelos foram altamente significativos, sendo possível construir as superfícies de respostas (Figura 5) e definir as regiões de interesse.

Figura 5 – Superfícies de resposta em função do tempo de imersão e das concentrações de ácido ascórbico (a) e ácido cítrico (b) para a atividade da enzima PPO.



Através das superfícies de resposta geradas pelos modelos, pode-se obter as condições de concentração dos ácidos e do tempo para que a atividade enzimática resulte em um menor valor de atividade enzimática. Para o ácido ascórbico, é possível verificar através da superfície de resposta (Figura 5a) que a faixa de concentração ótima do ácido é de 4,0 a 4,6%, para tempo de imersão de 1 a 2 minutos. Para o ácido cítrico (Figura 5b), a faixa ótima de concentração do ácido é de 2,4 a 4% e um tempo de 8,5 a 9 minutos. Por razões práticas, optou-se pelas concentrações de 4,6% e 2,4% para os ácidos cítrico e ascórbico, respectivamente. Embora o tempo de permanência na solução ácida não tenha sido significativo, optou-se considerar os valores obtidos pela regressão sem a incorporação dos termos não significativos ao cálculo dos resíduos. Desta forma, as condições ótimas de tempo de permanência em solução seriam de aproximadamente 9 minutos para ácido cítrico e 2 minutos para o ácido ascórbico.

2.3.3 Fruto-oligossacarídeos

Os tratamentos nas condições definidas no item 2.3.2 foram submetidos à quantificação dos teores de fruto-oligossacarídeos (FOS) e os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Teores de fruto-oligossacarídeos no yacon sem tratamento e no yacon após os tratamentos com ácido cítrico e ácido ascórbico, nas faixas de concentração e tempos ótimos de imersão.

Amostra	FOS (g/200 mL)
Yacon sem tratamento	16,26
Yacon com tratamento (2,4% de ácido cítrico por 9 min)	14,44
Yacon com tratamento (4,6% de ácido ascórbico por 2 min)	13,68

Através da Tabela 5 pode-se observar que os dois tratamentos ácidos, nas faixas ótimas de concentração e tempos (2,4% de ácido cítrico por 9 minutos ou 4,6% de ácido ascórbico por 2

minutos) apresentaram pouca alteração na concentração de FOS das amostras, visto que o yacon sem tratamento apresentou 16,26 g de FOS/ 200 mL, enquanto o yacon tratado com ácido cítrico apresentou 14,44 g de FOS /200 mL e tratado com ácido ascórbico, 13,68 g de FOS /200 mL, indicando que os tratamentos estudados foram adequados para o processamento da raiz. As concentrações de fruto-oligossacarídeos obtidas em ambos tratamentos estão acima do mínimo exigido pela legislação sanitária (BRASIL, 2008) para que um alimento possa ter alegação funcional relativa a esse componente (1,5 g/200mL de produto). Desta forma, o produto obtido em ambos processos pode ser incorporado em bebidas funcionais, sendo uma importante fonte de fruto-oligossacarídeos e conseqüentemente, de compostos prebióticos para o produto alimentício.

2.4 CONCLUSÕES

Ao final deste estudo conclui-se que o tratamento do yacon com os ácidos ascórbico e cítrico foi eficaz visando a inativação da enzima PPO, sendo estabelecidas as seguintes condições ótimas: concentração de ácido ascórbico de 4,6% com tempo de imersão de 2 minutos; ou concentração de ácido cítrico de 2,4% durante 9 minutos. Ambos os tratamentos foram adequados para o processo, pois além de terem inativado a enzima estudada, não diminuíram expressivamente os teores de FOS, tornando viável os tratamentos de inativação da PPO do yacon. Para a etapa posterior deste estudo optou-se pelo uso do ácido cítrico por ter alterado menos o teor de FOS em relação ao tratamento com ácido ascórbico, e por ser mais viável economicamente.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2008. 596 p.
- AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. **Food Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 59-67, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 20/12/2013.
- CAMPOS, D.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; CHIRINOS, R.; AGUILAR-GALVEZ, A.; NORATTO, G.; PEDRESCHI, R. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1592-1599, 2012.
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.
- FERNÁNDEZ, E.; RAJCHL, A.; LACHMAN, J.; CÍZKOVÁ, H.; KVASNICKA, F.; KOTÍKOVÁ, Z.; MILELLA, L.; VOLDRICH, M.. Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short-and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots. **LWT-Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 80-86, 2013.
- GAWLIK-DZIKI, U.; ZŁOTEK, U.; ŚWIECA, M. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativavar capitata* L.). **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 129-135, 2008.
- GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M.G.A.; CARNEIRO, G.E.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 69-72, 2001.
- GRAEFE, S.; HERMANN, M.; MANRIQUE, I.; GOLOMBEK, S.; BUERKERT, A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**, v. 86, n. 2, p. 157-165, 2004.
- HORWITZ, W.; LATIMER J. R.; GEORGE, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 18. ed. 2005. Current through revision 3, 2010. Gaithersburg: AOAC, 2010. Chapter 45, met. 999.03, p. 96-98.
- KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 147-154, 2001.

LACHMAN, J.; FERNANDEZ, E. C.; ORSAK, M. Yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. Et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use - A review. **Plant Soil Environment.**, v. 49, n. 6, p. 283- 29, 2003.

LACHMAN, J.; HAVRLAND, B.; FERNÁNDEZ, E.C .; DUDJAK, J. Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. **Plant Soil and Environment**, v. 50, n. 9, p. 383-390, 2004.

LUPETTI, K. O.; CARVALHO, L. C. D.; MOURA, A. F. D.; FATIBELLO-FILHO, O. Análise de imagem em química analítica: empregando metodologias simples e didáticas para entender e prevenir o escurecimento de tecidos vegetais. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 548-554, 2005.

NEVES, V. A.; SILVA, M. A. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2424-2430, 2007.

NI EIDHIN, D. M.; MURPHY, E.; O'BEIRNE, D. Polyphenol oxidase from apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley's Seedling): purification strategies and characterization. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. 51-58, 2006.

OKTAY, M.; KÜFREVIOLU, I.; KOCAÇALIŞKAN, I.; ŞAKLROLU, H. Polyphenoloxidase from *Amasya apple*. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 494-496, 1995.

PASSOS, L. M. L., PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PAZ, J. C. S. N. **Caracterização bioquímica da polifenoloxidase e da peroxidase de ameixa rubimel, polpa de cacau e estudo do efeito de agentes anti-escurecimento.** 2010, 85 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5278-5284, 2003.

RAPEANU, G.; LOEY, A. V.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. Sativa). **Food Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 253-261, 2006.

RODRIGUEZ, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 1 ed. Campinas: Casa do Pão Editora. 2005.

SANTANA, I.; CARDOSO, M. H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 898-905, 2008.

SILVA, R. F. Use of inulin as a natural texture modifier. **Cereal Foods World**, v. 41, n. 10, p. 792-794, 1996.

TAKENAKA, M.; YAN, X.; ONO, H.; YOSHIDA, H.; NAGATA, T.; NAKANISHI, T. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 3, p. 793- 96, 2003.

VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* – prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers**, v.147, n. 2, p.119-130, 2003.

YAN, X.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SADA, Y.; NAKANISHI, T.; NAGATA, T. Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n. 11, p. 4711-4713, 1999.

YEMENICIOGLU, A.; CEMEROGLU, B. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca L.*): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2371-2379, 2003.

ZEMEL, G. P.; SIMS, C.A.; MARSHALL, M. R.; BALABAN, M. Low pH inactivation of polyphenol-oxidase in apple juice. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 2, p. 562-563, 1990.

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS PREBIÓTICAS DE FRUTAS TROPICAIS E YACON

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de duas bebidas prebióticas, sendo uma de frutas tropicais e yacon, e uma de caju e yacon, por meio de delineamento do tipo DCCR (Delineamento Central Composto Rotacional) 2^2 , sendo as variáveis: concentração de extrato de yacon e concentração do edulcorante estévia. Foram desenvolvidas 22 formulações (11 de frutas tropicais e extrato de yacon, e 11 de caju e extrato de yacon), sendo a concentração das variáveis determinadas de acordo com o planejamento estatístico. Através da superfície de resposta foram determinadas as concentrações de edulcorante e de extrato de yacon que resultaram em maior aceitabilidade das bebidas. As bebidas desenvolvidas foram caracterizadas através de análises físico-químicas sensoriais, além da determinação de sua atividade antioxidante e fruto-oligossacarídeos, após processamento térmico. Devido aos consideráveis valores encontrados para atividade antioxidante, o ensaio antiproliferativo das formulações também foi realizada utilizando-se células HepG₂. Para a aceitação sensorial das bebidas formuladas a concentração de edulcorante foi determinante na avaliação dos julgadores, enquanto que a concentração de extrato de yacon não influenciou significativamente sua aceitação. A bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A) apresentou maiores teores de compostos fenólicos e consequente maior atividade antioxidante que a bebida prebiótica de caju (Bebida B), devido provavelmente a presença das polpas de acerola, açaí e camu-camu, por serem frutas ricas em vitamina C e compostos fenólicos. Porém, os resultados da atividade antiproliferativa das bebidas mostraram que não houve correlação com a atividade antioxidante e compostos fenólicos, uma vez que a Bebida B apresentou melhores resultados para inibição do desenvolvimento de células tumorais (HepG₂) em condições *in vitro*.

Palavras-chave: bebida prebiótica, frutas tropicais, compostos bioativos, yacon.

ABSTRACT

The aim of this work was develop two prebiotic beverages of tropical fruits and yacon extract made by CCD design type 2², wherein the variables was "yacon extract concentration" and "sweetener stevia concentration". In this way, 22 formulations (11 of tropical fruits and yacon extract, and 11 of cashew apple and yacon extract) were developed with the concentration of the variables determined in accordance with the statistical design. Through the response surface, the sweetener and the yacon extract concentrations were determined and resulted in greater acceptability of beverages. Based on this results, two formulations were selected and called Beverage A (prebiotic beverage of tropical fruit and yacon) and Beverage B (prebiotic beverage cashew apple and yacon). The developed beverages were characterized by sensory and physicochemical analysis, antioxidant activity and fructo-oligosaccharides content after the thermal processing. Furthermore the antiproliferative test of formulations was also carried out, using HepG₂ cells. The results showed that the concentration of sweetener was determinative in the evaluation of judges, while the concentration of yacon extract did not significantly influence their acceptance. The prebiotic beverage of tropical fruit and yacon (Beverage A) showed higher content of phenolic compounds and consequent higher antioxidant activity than the prebiotic drink cashew (Beverage B). This occurred probably due to the presence of acerola, acai and camu-camu pulps. However, the results of the antiproliferative activity of beverages showed no correlation with phenolics and antioxidant activity, since the Beverage B showed best results for growth inhibition of tumor cells (HepG₂) in vitro conditions, compared with Beverage A. Thus, it was possible to verify the influence of the variables in the acceptability of beverages, characterize them, particularly with respect to its bioactive components, and check their effects on cell growth of liver cancer cells .

Keywords : prebiotic drink, tropical fruits, bioactive compounds, yacon.

3.1 INTRODUÇÃO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*), recentemente introduzido no Brasil, vem despertando o interesse do mundo científico devido ao seu potencial como alimento funcional, principalmente pelo seu elevado conteúdo de fruto-oligossacarídeos (FOS) (ALBUQUERQUE; ROLIM, 2012). Uma das principais características dos FOS é o estímulo do crescimento de bactérias não-patogênicas por meio da fermentação colônica, levando à modulação da composição da microbiota natural do intestino grosso, sendo assim classificados como constituintes bioativos com alegação prebiótica (VASCONCELOS *et al.*, 2010; MEIER; LOCHS, 2007).

Os FOS não sofrem ação das enzimas gástricas e passam facilmente pelo trato digestório, resultando em um aporte calórico reduzido, em efeitos benéficos na função intestinal e em não elevar as concentrações de glicose sanguínea (PASSOS; PARK, 2003; LACHMAN *et al.*, 2004; BOEING; LIBERALI; COUTINHO, 2012). Portanto, esses compostos estão também diretamente relacionados ao controle glicêmico, sendo o uso do yacon difundido entre os portadores de diabetes, os quais necessitam de controle regular da glicemia, sendo um coadjuvante no tratamento desta doença (MIURA, 2007; MIURA; ITOH; ISHIDA, 2004; BARONI *et al.*, 2008; BOEING; LIBERALI; COUTINHO, 2012). Além disso, essa raiz tuberosa ainda apresenta consideráveis concentrações de polifenóis (YAN *et al.*, 1999; MARUTA; KAWABATA; NIKI, 1995; CHUDA *et al.*, 1998), além de outros compostos bioativos, como carotenoides (QUINTEROS, 2000) e triptofano (YAN *et al.*, 1999), que contribuem para a atividade antioxidante desta raiz.

Tem-se demonstrado que os indivíduos que consomem diariamente cinco ou mais porções de frutas e hortaliças têm aproximadamente metade do risco de desenvolver diversos tipos de câncer, particularmente aqueles do trato gastrointestinal. Estudos realizados por Dembitsky *et al.*, (2011) e Pereira (2014) relataram que Burton-Freeman (2010) associa o consumo de vegetais ricos em compostos fenólicos ao aumento da capacidade antioxidante no sangue.

Assim como o yacon, diversas frutas tropicais apresentam uma variedade de compostos bioativos que estão associadas a sua atividade antioxidante e, conseqüentemente, aos benefícios à saúde. Devido à diversidade de frutas e dos compostos naturalmente presentes nesses alimentos, é vantajoso combinar diferentes frutas a fim de obter produtos com características sensoriais diversificadas somadas aos componentes nutricionais e funcionais (SOUSA, 2006).

O açaí é conhecido por conter fitoquímicos associados a benefícios na saúde, como as antocianinas, devido à capacidade antioxidante desses compostos (PORTINHO *et al.*, 2012). Assim como o açaí, o camu-camu é uma fruta nativa da região Amazônica e se destaca pelo seu elevado conteúdo em vitamina C (SILVA; TASSARA, 2005; CARVALHO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2011), assim como a acerola, que também representa uma boa fonte desta vitamina. Por sua vez, o cajá possui fibras, cálcio, ferro, fósforo, vitamina A, vitamina C e o caju é conhecido pela riqueza em vitamina C, ácidos anacárdicos e pela sua vasta aplicação em produtos agroindustriais (CARVALHO *et al.*, 2013; RUFINO *et al.*, 2010).

O hábito de consumir sucos de frutas processadas tem aumentado no Brasil e no mundo, impulsionado pela falta de tempo da população em preparar o suco das frutas *in natura*, pela praticidade oferecida pelos produtos, pela substituição do consumo de bebidas carbonatadas devido ao seu valor nutritivo, e pela crescente preocupação em consumir alimentos mais saudáveis (MATSUURA; ROLIM, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005).

As bebidas formuladas a partir de yacon também representam uma das categorias mais interessantes para uso desta raiz em produtos processados. Isso ocorre devido à fácil incorporação desta raiz tuberosa nesses produtos e praticidade de consumo, podendo ser incorporado à dieta de diabéticos e da população em geral (SILVA, 2004; QUINTEROS, 2000). Com relação ao processamento de produtos visando a população diabética, o uso de edulcorantes faz-se necessário no controle dos níveis glicêmicos em substituição a açúcares de fácil absorção, como é o caso da sacarose. A estévia é um edulcorante natural bastante utilizado em alimentos e é conhecida por possuir em sabor amargo residual – *aftertaste* (GOTO; CLEMENTE, 1998; REZENDE *et al.*, 2004). Considerando seu sabor residual indesejado, a concentração de edulcorante é uma variável importante na formulação de um produto, pois poderá influenciar na sua aceitação ou rejeição sensorial.

Diversas são as ferramentas utilizadas para visualizar as relações entre diferentes variáveis e suas influências sobre as respostas. Dentre estas, destaca-se a metodologia de superfície de resposta, amplamente utilizada na otimização de processos, pois fornece respostas rápidas. Esta metodologia permite verificar a existência ou não de uma região ótima para as interações entre variáveis que se pretende avaliar. Pode ser aplicada quando uma resposta ou um conjunto de respostas de interesse são influenciadas por diversas variáveis (JÚNIOR *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de duas bebidas prebióticas, sendo uma bebida mista de frutas tropicais (abacaxi, acerola, açai, cajá, caju e camu-camu) e yacon, e uma bebida de caju e yacon. Para o desenvolvimento das formulações foram utilizados um planejamento estatístico de experimentos e a metodologia de superfície de resposta como ferramenta de otimização de processos. Desta forma, foi possível verificar a influência das variáveis concentração de extrato de yacon e concentração de edulcorante na aceitabilidade das bebidas, caracterizá-las com relação aos componentes bioativos e açúcares, e verificar seus efeitos sob o crescimento celular de células de câncer hepático - HepG₂.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Matéria prima

As polpas das frutas tropicais (abacaxi, açaí, acerola, cajá, caju e camu-camu) foram adquiridas no comércio de Fortaleza-CE e armazenadas em câmara de congelamento à temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, localizada no Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical. Por sua vez, o yacon foi adquirido no comércio local de Fortaleza-CE, e seu extrato foi obtido conforme **item 2.2.6 do CAPÍTULO 2**. O extrato foi armazenado em câmara de congelamento à temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. No momento do uso, as polpas de frutas e o extrato de yacon foram devidamente descongelados sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e as bebidas foram elaboradas segundo metodologia estatística descrita a seguir.

3.2.2 Desenvolvimento das bebidas prebióticas de frutas tropicais e yacon

Para o desenvolvimento das duas bebidas prebióticas foi utilizada a metodologia de superfície de resposta. Como edulcorante, optou-se pela estévia, por ser natural e possuir considerável poder edulcorante, considerando os indivíduos diabéticos como um dos potenciais consumidores destas bebidas. Foram desenvolvidas 11 formulações com um *blend* de frutas tropicais, contendo 20% de abacaxi, 5% açaí, 10% acerola, 5% cajá, 5% caju, 5% camu-camu (30 – 50%) e extrato de yacon (50 – 70%), (adaptado de PEREIRA *et al.*, 2014) e 11 formulações constituídas por polpa de caju (30 – 50%) e extrato de yacon (50 – 70%), de acordo com a Tabela 1. As proporções de extrato de yacon e polpas de frutas foram definidas de acordo com o delineamento estatístico do tipo DCCR (Delineamento Central Composto Rotacional), considerando as variáveis: concentração de extrato de yacon adicionado à bebida de frutas tropicais (em %: $+\alpha = 70$ e $-\alpha = 50$), e concentração de estévia (em %: $+\alpha = 0,1$ e $-\alpha = 0,01$). As proporções foram as mesmas na bebida de caju.

Para a análise estatística utilizou-se o programa Statistica 7.0, em que foram avaliadas as influências de cada variável do processo e as suas interações sobre a resposta de interesse com o objetivo de determinar os valores ótimos das variáveis independentes (concentração de extrato de yacon e concentração de estévia) em relação à variável dependente (aceitabilidade sensorial). Os modelos obtidos para as respostas experimentais foram avaliados em termos de sua significância

($P < 0,05$) e coeficientes de determinação (R^2) ao nível de 5% de probabilidade, e as superfícies de resposta foram utilizadas para analisar o comportamento do atributo aceitação global em função das concentrações de yacon e de estévia.

Tabela 1 – Variações das concentrações de extrato de yacon e de estévia

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração de extrato de yacon adicionado às frutas tropicais / caju (%)	50	53	60	67	70
Concentração de estévia (%)	0,01	0,055	0,07	0,087	0,1

3.2.3 Análise sensorial – aceitabilidade

A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Embrapa Agroindústria Tropical, de acordo com o Parecer Consubstanciado do CEP da Universidade Estadual do Ceará (Parecer número 147.279).

Para avaliação sensorial, as formulações foram preparadas no dia da análise, acondicionadas em garrafas e servidas aos julgadores em copos de polipropileno de 50 mL, identificados com códigos de três dígitos. Utilizou-se um delineamento casualizado em 3 blocos de forma que, para cada bebida houve 3 sessões, sendo as duas primeiras sessões compostas por 4 amostras, e a última por 3 amostras, seguindo o planejamento $2^2 + 2(2) + 3$ PC (totalizando 11 formulações de cada bebida). As bebidas foram avaliadas por 150 provadores não treinados, de ambos os sexos e com idades entre 18 e 45 anos. As amostras foram distribuídas aleatoriamente, com exceção das repetições no ponto central, as quais foram distribuídas uma em cada bloco. A aceitação das amostras foi avaliada pelo atributo impressão global, utilizando-se um escala hedônica estruturada de 9 pontos ancorados nos extremos pelos termos “desgostei muitíssimo” e “gostei muitíssimo”.

3.2.4 Processamento térmico das bebidas selecionadas

O processamento foi realizado no Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical. Para o processamento térmico, apenas duas formulações de bebidas prebióticas foram selecionadas, de acordo com os resultados da avaliação sensorial e análise do teor de FOS: uma composta por uma mistura de frutas tropicais e yacon, contendo 20% de abacaxi, 5% açaí, 10% acerola, 5% cajá, 5% caju, 5% camu-camu, 50% de extrato de yacon e 0,07% de estévia (Bebida A), e uma contendo caju e extrato de yacon, com 50% de caju, 50% de extrato de yacon e 0,07% de estévia (Bebida B). Para o processamento térmico, as formulações foram individualmente homogeneizadas em liquidificador industrial e levadas a um trocador tubular Armfield FT74X. Foi utilizada a temperatura de 85 °C e o tempo de 90 segundos. As formulações foram envasadas a quente (*hot fill*) em garrafas de vidro de 200 mL, previamente higienizadas com água clorada, e mantidas sob refrigeração (± 6 °C) para posteriores análises.

3.2.5 Análises microbiológicas das bebidas pasteurizadas

A caracterização microbiológica da bebida formulada foi avaliada pela determinação de coliformes fecais (NMP/mL) e *E.coli*, contagem de fungos filamentosos e leveduras e detecção de *Salmonella* spp., conforme a metodologia descrita no manual FDA's Bacteriological Analytical Manual (ANDREWS; HAMMACK, 2005; FENG; WEAGANT, 2002). O estudo foi realizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por cinco unidades amostrais.

3.2.6 Caracterização das bebidas prebióticas pasteurizadas

3.2.6.1 Caracterização físico-química

Os teores de umidade, proteína, lipídios, cinzas e sólidos solúveis foram determinados, respectivamente, pelos métodos nº 934.01, nº 984.13, nº 930.05, nº 930.05 e nº 932.12 da AOAC (1995). A quantidade total de carboidratos foi calculada por diferença: $100 - (\% \text{ água} + \%$

proteína + % lipídios + % cinzas). Os valores de pH foram determinados através de leitura direta das amostras em potenciômetro, e a acidez titulável foi realizada titulando-se a amostra com solução de NaOH 0,1M, utilizando a solução de fenolftaleína 1% como indicador (IAL, 2008).

3.2.6.2 Compostos bioativos

Ácido ascórbico

Foi quantificado utilizando método de titulometria com solução de 2,6 diclorofenolindofenol a 0,02% (DFI) até coloração rósea clara permanente, utilizando-se 1g de suco diluído em 50 mL de ácido oxálico 0,5% de acordo com Strohecker; Henning (1967).

Conteúdo de polifenóis totais e atividade antioxidante total

Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados segundo metodologia proposta por Larrauri, Ruperez; Saura-Calixto (1997), com modificações. As amostras de suco foram pesadas (g) em tubos de centrífuga e submetidas a extração sequencial, inicialmente com 4 mL de solução de metanol/água (50:50, v/v) a temperatura ambiente durante 60 minutos. Os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e recuperado em balão volumétrico (10 mL). Em seguida, foram adicionados ao precipitado da primeira extração, 4 mL da solução de acetona/água (70:30, v/v), a temperatura ambiente, extraiu-se durante 60 minutos e posteriormente foi realizada a centrifugação e a recuperação do extrato nas mesmas condições citadas anteriormente. O extrato de acetona foi adicionado ao extrato de metanol e em seguida, completou-se o volume final do balão para 10 mL com água destilada. Estes extratos foram mantidos em temperatura de -18 °C, durante um período máximo de 30 dias, sendo utilizados nas determinações de Polifenóis totais (TP) e Capacidade antioxidante total (TAC).

Polifenóis totais (TP)

Os polifenóis totais foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando curva padrão de ácido gálico como referência, conforme metodologia descrita por Larrauri, Ruperez; Saura-Calixto (1997). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente ao ácido gálico por 100 gramas de suco ($\text{mg GAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Capacidade antioxidante total (TAC) pelo método ABTS

A atividade antioxidante total foi determinada por meio de ensaio com o radical ABTS, método desenvolvido por Miller et al. (1993), com modificações propostas por Rufino et al. (2006a). O radical livre ABTS (2,2-AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) foi obtido pela reação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 μM). O sistema foi mantido em repouso e em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), durante 16 horas em ausência de luz. Uma vez formado o radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$, diluiu-se com etanol até obter um valor de absorvância entre 700 a 705 nm. A leitura espectrofotométrica foi realizada exatamente após 6 minutos, a partir da mistura do radical com o extrato em um comprimento de onda de 734 nm. Utilizou-se uma alíquota de 30 μL de amostra e 3 mL de radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$. A curva gerada a partir dos valores das absorvâncias e das concentrações das amostras foi calculada. Os valores da TAC foram obtidos substituindo-se o valor de “y” na equação da reta pela absorvância equivalente a 1000 μM Trolox, sendo os resultados expressos em μM Trolox/g.

Capacidade antioxidante total (TAC) pelo método DPPH \cdot

Esse método é baseado na captura do radical DPPH^{\cdot} (2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil) por antioxidantes, que produz um decréscimo da absorvância a 515 nm. A atividade do antirradical expressa pelo parâmetro EC_{50} e definida como a quantidade do antioxidante necessário para reduzir 50% da concentração do DPPH^{\cdot} inicial de acordo com Brand-Williams *et al.* (1995) e com modificações sugeridas por Rufino *et al.* (2007). Os resultados foram expressos em g suco/g de DPPH^{\cdot} .

Capacidade antioxidante total (TAC) pelo método FRAP

O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mede o poder antioxidante da redução do Ferro, conforme metodologia descrita por Benzie; Strain (1996) e Pulido *et al.* (2000), com modificações feitas por Rufino *et al.* (2006b). A partir dos extratos obtidos anteriormente, foram preparados em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata de cada extrato. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90 μL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio, sendo acrescentado 270 μL de água destilada, e 2,7 mL do reagente FRAP (80% de tampão de acetato, 10% TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM e 10% de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, usado imediatamente após sua preparação), em seguida as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos e mantidas em banho-maria a 37° C. A leitura foi realizada após 30 minutos do preparo da mistura, no comprimento de onda de 595 nm, o reagente FRAP foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. A curva gerada a partir dos valores das absorvâncias e das concentrações das amostras foi calculada. Os valores da AAT foram obtidos substituindo-se o valor de “y” na equação da reta pela absorvância equivalente a 1000 μM de sulfato ferroso, sendo os resultados expressos em μM $\text{F}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de suco.

3.2.6.3 Determinação de fruto-oligossacarídeos, sacarose, frutose e glicose

O teor de FOS das amostras foi determinado segundo Horwitz *et al.* (2010). Para a determinação de sacarose, frutose e glicose, foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Varian 3380) equipado com duas bombas (modelo ProStar 210), injetor automático (modelo 410), detector de índice de refração (modelo ProStar 355), coluna analítica Hiplax Pb (8 μm , 300 x 7,7mm ID) e pré-coluna Hiplax Pb (50 x 7,7 mm ID). A temperatura da coluna foi de 65 °C, fluxo isocrático de 0,6 mL/min, água grau HPLC como fase móvel e tempo de análise de 35 minutos.

3.2.6.4 Inibição da atividade proliferativa de células HepG₂

A atividade antiproliferativa das bebidas prebióticas foi medida pelo ensaio de MTS (ensaio de proliferação celular não radioativo com titulação de células à base de MTS 96), tal como descrito por Sun *et al.* (2002). Células HepG₂ (ATCC, Rockville, MD) foram mantidas em meio de Williams e (WME), contendo Heps 10 mM, 5 µg /ml de insulina, 2 mg/ mL de glucagon, 0,05 µg /mL de hidrocortisona, e 5% de soro bovino fetal. As células HepG₂ foram incubadas a 37 °C em 5% de CO₂. Um total de $1,0 \times 10^4$ células HepG₂ do meio de crescimento foram colocadas poços de uma microplaca de 96 poços de fundo plano. Após 4 h de incubação a 37 °C em 5% de CO₂ o meio de crescimento foi substituído por meio contendo diferentes concentrações de bebida prebiótica (1 a 10 mg.ml⁻¹). As culturas controle receberam a solução de extração, menos as bebidas prebióticas e poços branco, que continham 100 mL de meio de crescimento sem células. Após 72 horas de incubação, a proliferação celular foi determinada por ensaio colorimétrico MTS. A proliferação celular (%) foi determinada a partir da absorvância MTS (490 nm) para leitura de cada concentração em comparação com o controle. Três repetições para cada amostra foram utilizadas para determinar a proliferação celular.

3.2.6.5 Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA), e Tukey-Kramer, utilizando-se o software Prism 3.0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio padrão, cujos valores $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios realizados, sendo 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios nos pontos axiais, e três pontos centrais, seguiram a matriz do delineamento estatístico descrita abaixo (Tabela 2). Nesta tabela também podem ser visualizados os resultados da aceitabilidade sensorial das bebidas prebióticas.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental completo (valores reais) das concentrações de edulcorante e de extrato de yacon, com as respostas da aceitabilidade sensorial.

Ensaio	Edulcorante (%)	Extrato de yacon (%)	Aceitabilidade Bebida A	Aceitabilidade Bebida B
1	0,055	53	6,1	6,1
2	0,087	53	6,3	6,6
3	0,055	67	6,0	6,0
4	0,087	67	6,6	7,0
5	0,01	60	4,5	5,0
6	0,1	60	6,8	7,0
7	0,07	50	6,6	7,0
8	0,07	70	6,8	7,0
9	0,07	60	6,9	7,0
10	0,07	60	7,0	7,0
11	0,07	60	6,9	7,0

Considerando Bebida A: bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon; Bebida B: bebida prebiótica de caju e yacon.

Os coeficientes de regressão, erro padrão, o valor t_{calc} , o p -valor e os limites de confiança para a aceitabilidade das bebidas são apresentados nas tabelas 3 e 4. Para ambas as bebidas, os valores mostram que foram significativos apenas os termos linear e quadrático da variável “concentração de edulcorante” (%).

Tabela 3 – Coeficientes de regressão do DCCR para aceitabilidade da bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A).

Fator	Coef. de regressão	Erro padrão	t(5)	P-valor	- 95% limite de confiança	+95% limite de confiança
<i>Média</i>	6,93	0,22	30,59	0,000	6,35	7,52
<i>Edulcorante L</i>	0,51	0,14	3,65	0,015	0,15	0,86
<i>Edulcorante Q</i>	-0,62	0,16	-3,77	0,013	-1,05	-0,198
*E. Aq. Yacon L	0,60	0,14	0,43	0,68	-0,296	0,42
*E. Aq. Yacon Q	-0,097	0,16	-0,59	0,58	-0,52	0,33
Edulcorante x E. Aq. Yacon	0,10	0,196	0,51	0,63	-0,40	0,60

Fatores em itálico são estatisticamente significativos ao nível $P < 0,05$. *E. A.q Yacon = extrato aquoso de yacon

Tabela 4 – Coeficientes de regressão do DCCR para aceitabilidade da bebida prebiótica de caju e yacon (Bebida B).

Fator	Coef. de regressão	Erro padrão	t(5)	P-valor	- 95% limite de confiança	+95% limite de confiança
<i>Média</i>	7,00	0,13	54,99	0,000	6,67	7,33
<i>Edulcorante L</i>	0,54	0,08	6,94	0,001	0,34	0,74
<i>Edulcorante Q</i>	- 0,52	0,09	-5,59	0,002	-0,76	-0,28
*E. Aq. Yacon L	0,04	0,08	0,48	0,650	-0,16	0,24
*E. Aq. Yacon Q	-0,19	0,09	-0,20	0,848	-0,26	0,22
<i>Edulcorante x *E. Aq. Yacon</i>	0,12	0,11	1,13	0,309	-0,16	0,41

Fatores em itálico são estatisticamente significativos ao nível $P < 0,05$. *E. Aq. Yacon = extrato aquoso de yacon.

A avaliação estatística pela ANOVA para a aceitabilidade das duas bebidas desenvolvidas, considerando apenas os termos estatisticamente significativos, está apresentada nas tabelas 5 e 6. O coeficiente de determinação foi igual a 84,97% e 94,33% para as bebidas A e B, respectivamente. A análise do R^2 e do valor F mostrou que o modelo foi adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta

Tabela 5 - ANOVA para a bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	4,24	2	2,12	4,76	0,0001
Resíduos	0,89	8	0,45		
Total	5,13	10	0,513		

% variação explicada (R^2) = 84,97 $F_{2; 8; 0,05} = 4,46$

Tabela 6- ANOVA para a bebida prebiótica de caju e yacon (Bebida B).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	P - valor
Regressão	3,86	2	1,93	38,6	0,0001
Resíduos	0,43	8	0,05		
Total	4,29	10	0,43		

% variação explicada (R^2) = 94,33 $F_{2; 8; 0,05} = 4,46$

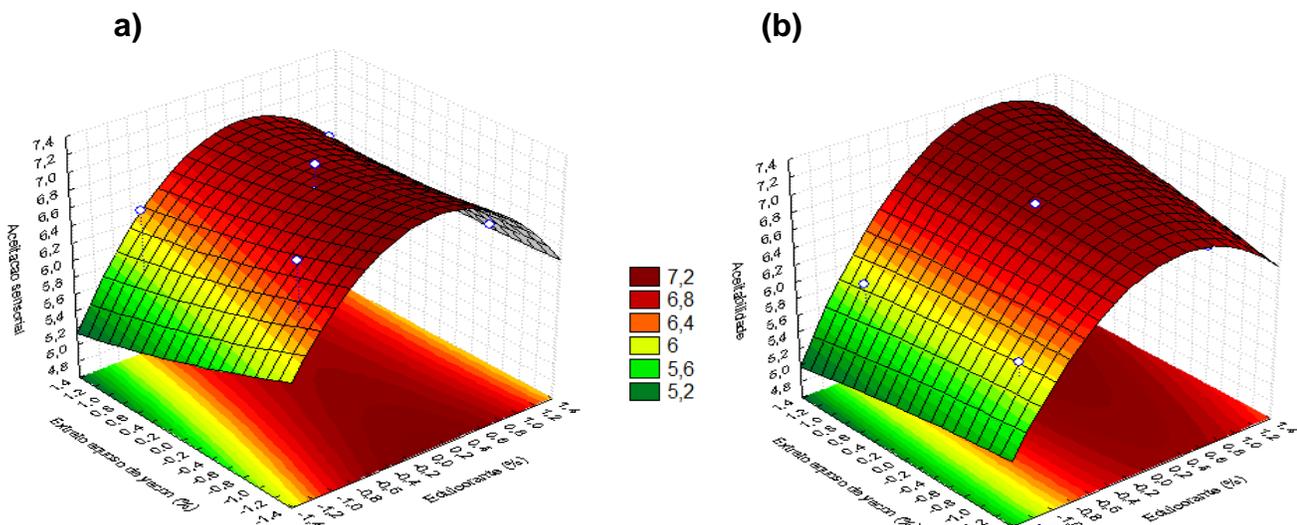
Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos (Equação abaixo descrita).

$$\text{Aceitabilidade Bebida A} = 6,9 + 0,51 \text{ Educolorante} - 0,62 \text{ Edulcorante}^2 \text{ (Equação 1)}$$

$$\text{Aceitabilidade Bebida B} = 7,0 + 0,54 \text{ Edulcorante} - 0,51 \text{ Edulcorante}^2 \text{ (Equação 2)}$$

Através da superfície de resposta gerada pelos modelos (Figura 1), pode-se obter as concentrações de edulcorante e de extrato de yacon que resultam em maior aceitabilidade das bebidas. É possível verificar que para o edulcorante, a faixa ótima foi de 0,06 a 0,09% para ambas as bebidas, sendo que a concentração de extrato de yacon não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$) para a aceitação sensorial das bebidas. Desta forma, considerando os custos das matérias-primas empregadas, as formulações contendo 50% de yacon e 0,07% de edulcorante (estévia) foram selecionadas para ambas as bebidas prebióticas.

Figura 1 – Superfície de resposta em função da concentração de edulcorante (%) e extrato de yacon (%), com valores codificados para os dois tipos de bebidas. (a) bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon e (b) bebida prebiótica de caju e yacon.



3.3.1. Análises microbiológicas das bebidas pasteurizadas

A presença de coliformes fecais, *E.coli*, *Salmonella* e fungos filamentosos não foi constatada nas amostras avaliadas, indicando que o processamento térmico adotado (85 °C por 90 segundos) atende aos critérios de segurança microbiológica preconizado pela legislação brasileira para suco (BRASIL, 2001) e que as bebidas pasteurizadas encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela referida legislação.

A elevada acidez e conseqüente baixo pH (pH < 4,5) da maioria dos sucos de frutas não permite o crescimento de microrganismos patogênicos, permitindo somente a proliferação de microrganismos deteriorantes, que são eliminados com temperaturas de pasteurização de 85 a 95 °C durante 1 a 2 minutos (SILVA; TAN; FARID, 2012).

3.3.2. Aceitabilidade das bebidas pasteurizadas

As Figuras 2 e 3 ilustram a aceitabilidade das bebidas desenvolvidas, em histogramas de frequência. A aceitação das amostras foi avaliada pelo atributo impressão global, utilizando-se um escala hedônica estruturada de 9 pontos ancorados nos extremos pelos termos “desgostei muitíssimo” (1) e “gostei muitíssimo” (9).

Figura 2 – Histograma de frequência com valores hedônicos atribuídos a bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon – Bebida A. (1=desgostei muitíssimo; 2=desgostei muito; 3=desgostei; 4=desgostei pouco; 5=nem gostei, nem desgostei; 6=gostei pouco; 7=gostei; 8=gostei muito; 9=gostei muitíssimo).

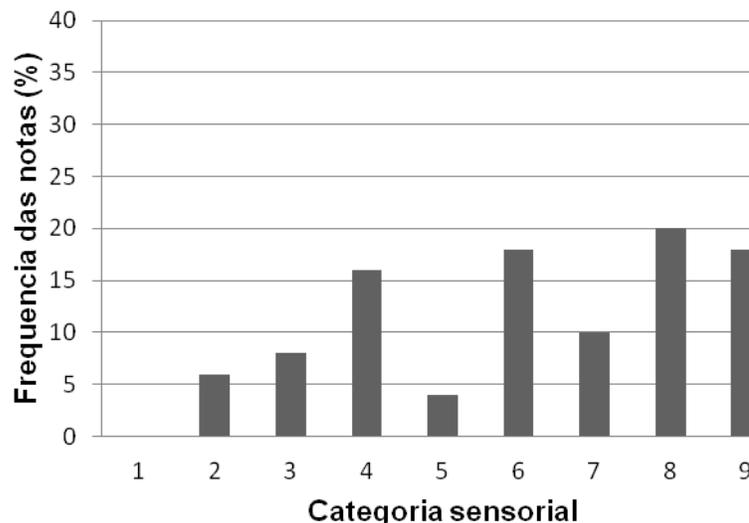
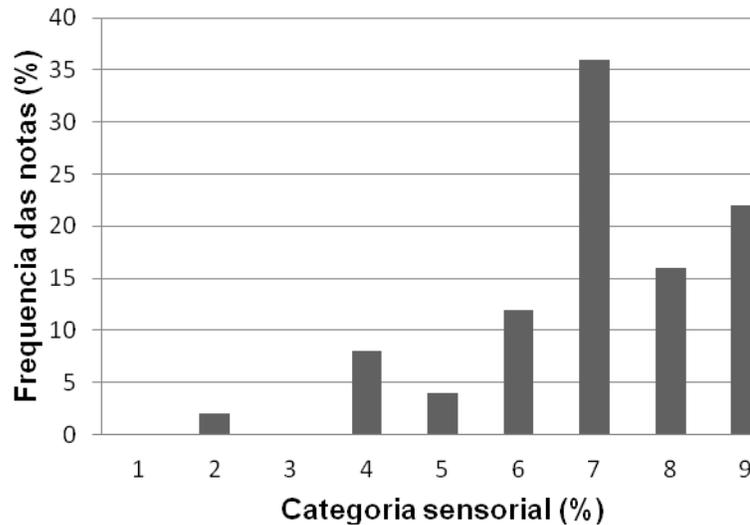


Figura 3 – Histograma de frequência com valores hedônicos atribuídos a bebida prebiótica de caju e yacon – Bebida B. (1=desgostei muitíssimo; 2=desgostei muito; 3=desgostei; 4=desgostei pouco; 5=nem gostei, nem desgostei; 6=gostei pouco; 7=gostei; 8=gostei muito; 9=gostei muitíssimo).



A pasteurização, além de garantir a segurança microbiológica do produto manteve uma aceitação das bebidas (Figuras 2 e 3) com média de 6,2 com 66% das respostas na faixa de aceitação (notas de 6 a 9) para a Bebida A de 7,1 com 86% das respostas na faixa de aceitação (notas de 6 a 9) para a Bebida B.

Embora as duas bebidas tenham sido aceitas sensorialmente, acredita-se que a Bebida A tenha obtido menores notas na aceitação devido à presença da polpa de camu-camu, que possui elevada acidez, amargor e adstringência (MAEDA *et al.* 2006).

Vidigal *et al.* (2011) avaliaram a aceitação sensorial de quatro sucos de açaí, camu-camu, cajá e umbu, e observaram que os sucos de cajá e umbu apresentaram maior aceitação sensorial, enquanto o suco de camu-camu obteve a maior rejeição sensorial. Souza-Filho *et al.* (2002) obtiveram baixa aceitação sensorial para um néctar elaborado com elevadas concentrações de polpa de camu-camu. Pereira (2014) verificou um efeito negativo da polpa de camu-camu na aceitação sensorial de uma bebida semelhante à Bebida A deste estudo, porém demonstrou que a contribuição do camu-camu no aumento dos níveis de compostos bioativos é relevante, e que apesar de possuir atributos sensoriais que podem influenciar negativamente na aceitação sensorial, esta fruta pode ser associada com outros frutos para aumentar a sua aceitação.

Silva *et al.* (2011) em estudo com néctares mistos de manga e cajá adicionados de fruto-oligosacarídeos ou inulina obtiveram melhor resultado sensorial para as bebidas adicionadas de FOS e afirmaram que o produto enriquecido com FOS torna-se uma nova opção de “alimento funcional” para as indústrias de sucos, bem como atende às expectativas dos consumidores que buscam alimentos saudáveis, nutritivos e saborosos.

3.3.3. Análises físico-químicas e perfil de compostos bioativos das bebidas prebióticas pasteurizadas

Os resultados dos parâmetros físico-químicos das bebidas prebióticas pasteurizadas podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios de pH, sólidos solúveis, acidez, umidade, cinzas e proteínas das duas bebidas desenvolvidas.

Parâmetros físico-químicos	Bebida A	Bebida B
pH	3,50	3,94
Sólidos solúveis (°Brix)	11,0	10,8
Acidez (% em ácido cítrico)	0,59	0,34
Cinzas (%)	0,34	0,30
Umidade (%)	88,10	87,91
Proteínas (%)	4,14	3,66

Bebida A: bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon; Bebida B: bebida prebiótica de caju e yacon.

Como esperado, a bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon apresentou uma maior acidez e um menor pH que a bebida prebiótica de caju e yacon. Isso ocorre devido, principalmente, à presença de camu-camu e acerola nesta formulação. Lima *et al.* (2008) em estudo com bebidas mistas à base de água de coco e acerola verificaram nas formulações uma variação de pH de 3,38 a 3,45 e acidez de 0,44 – 0,50%. Pereira *et al.* (2009) estudando bebidas mistas de água de coco, abacaxi e acerola obtiveram valores de pH das bebidas variando de 3,82 a 4,32, sólidos solúveis variando de 10,33 a 11,76 e acidez 0,24 – 0,52%. A Bebida A, portanto, apresentou valores de pH, sólidos solúveis e acidez em acordo com a literatura.

A Bebida B apresentou valor médio de pH de 3,94, 10,8 °Brix para sólidos solúveis e acidez de 0,34%. Pinheiro *et al.* (2006) em estudo com sucos de caju de diferentes marcas comerciais verificaram uma variação de pH entre 2,72 e 3,17, sólidos solúveis entre 12,5 e 13,3 °Brix e acidez entre 2,96 e 4,02. Em estudo com suco de caju envasado pelo processo *hot fill*, Fonseca (2010) obteve valores médios de sólidos solúveis de 11,1 °Brix, pH de 3,62 e acidez de

0,23%. Sancho *et al.* (2007) avaliaram suco de caju com alto teor de polpa e os parâmetros físico-químicos obtidos após a pasteurização foram de 11,10 °Brix para sólidos solúveis e pH de 3,73. Os valores obtidos para a bebida de caju e yacon são próximos aos encontrados na literatura, indicando que o presente trabalho está em acordo com a literatura.

A atividade antioxidante, os teores de fenólicos totais e fruto-oligossacarídeos das bebidas prebióticas pasteurizadas podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Capacidade antioxidante total (TAC), fenólicos totais (TP) e açúcares das Bebidas A e B.

Compostos bioativos	Bebida A*	Bebida B*
Fenólicos totais (mg GAE /100g)	126,83	66,52
Ácido ascórbico (mg/100g)	171,64	83,54
Fruto-oligossacarídeos (g/200 ml)	4,64	5,94
FRAP ($\mu\text{M F}_2\text{SO}_4/\text{g}$)	33,45	15,58
ABTS ($\mu\text{M Trolox/g}$)	10,57	6,45
DPPH* (g de suco/ g DPPH)	866,36	1780,14
Sacarose (g/100mL)	0,69	n.d.**
Frutose (g/100mL)	0,31	0,58
Glicose (g/100mL)	0,27	0,54

***Bebida A:** bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon; **Bebida B:** bebida prebiótica de caju e yacon.

**Considerando: n.d. = não determinado.

Os resultados de atividade antioxidante total, por todos os métodos avaliados mostram que a Bebida A apresentou aproximadamente o dobro de atividade antioxidante quando comparada à Bebida B. Esses resultados estão de acordo com o esperado, pois frutas tropicais como camu-camu e acerola apresentam maiores concentrações de ácido ascórbico que o caju (SILVA; TASSARA, 2005) e para essa frutas presentes na Bebida A, o ácido ascórbico está diretamente relacionado ao maior valor de atividade antioxidante total (RUFINO *et al.*, 2010) encontrado para essa bebida. Além disso, o açaí possui alto teor de antocianinas presentes em sua composição (FREGONESI *et al.*, 2010), o que possivelmente também contribuiu para esses resultados. A Bebida A apresentou alto teor de fenólicos totais, 126,83 mg GAE /100g e alta capacidade antioxidante, com valores de 10,57 $\mu\text{M Trolox/g}$ (ABTS), 33,45 $\mu\text{M F}_2\text{SO}_4/\text{g}$ (FRAP) e 866,36 g de suco/ g DPPH* (DPPH). Pereira *et al.* (2014) obtiveram resultados próximos aos encontrados no presente trabalho, em uma formulação semelhante à Bebida A, com valores de 103,01 mg GAE /100g (TP), 10,27 $\mu\text{M Trolox/g}$ (ABTS), 32,86 $\mu\text{M F}_2\text{SO}_4/\text{g}$ (FRAP) e 845,87 g de suco/ g DPPH (DPPH), mostrando que os resultados obtidos estão em acordo com a literatura.

Em estudo realizado por Silva *et al.* (2011) na elaboração de néctares mistos à base de manga e cajá adicionados de fruto-oligossacarídeos, o teor de TP foi de 20,35 mg GAE /100g, resultados inferiores aos obtidos neste trabalho. Pereira *et al.* (2009), em estudo com formulações mistas de água de coco, abacaxi e acerola obtiveram resultados de PT variando de 29,60 a 150,79 mg GAE/100g, sendo a formulação com a maior porcentagem de acerola a de maior resultado em fenólicos (150,79 mg GAE /100g) e antioxidantes totais (12,67 μ M Trolox/g), valores superiores aos obtidos no presente trabalho.

3.3.4. Determinação de fruto-oligossacarídeos, sacarose, frutose e glicose

Ambas as bebidas apresentaram consideráveis valores de atividade antioxidante, além de elevada concentração de fruto-oligossacarídeos, mesmo após a pasteurização. Segundo a legislação brasileira, as alegações aprovadas relacionadas à propriedade funcional e/ou de saúde de um nutriente ou não nutriente do alimento, conforme o item 3.3 da Resolução nº 18/1999 (BRASIL, 1999), englobam os fruto-oligossacarídeos. Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de FOS se o alimento for sólido (por porção) ou 1,5 g se o alimento for líquido (em 200 mL).

A bebida prebiótica de caju e yacon apresentou $5,94 \pm 0,07$ de FOS/200 mL, e a bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon, $4,64 \pm 0,07$ de FOS/200 mL, cerca de quatro vezes mais do que a exigida pela legislação brasileira de produtos com propriedades funcionais (BRASIL, 2008). A alegação permitida pela legislação brasileira é “*os fruto-oligossacarídeos – FOS contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis*”.

3.3.5. Inibição da atividade antiproliferativa de células HepG₂

O metabolismo humano em seu estado normal apresenta equilíbrio entre os níveis de compostos oxidantes e antioxidantes, e isso é importante para a manutenção das condições fisiológicas ótimas (TEMPLE, 2000; THOMPSON, 1994). A superprodução de oxidantes em certas condições pode causar um desequilíbrio, que pode conduzir a danos oxidativos a moléculas como lípidos, proteínas e ao DNA (LIU, 2004). Evidências sugerem que este dano oxidativo que induz potencialmente ao câncer pode ser impedido ou limitado por compostos presentes em frutas

e legumes, como os fitoquímicos, que apresentam mecanismos de ação complementares e sobrepostos aos agentes oxidantes, à estimulação do sistema imunológico, à regulação da expressão do gene da proliferação celular e da apoptose, ao metabolismo hormonal, e aos efeitos anti-bacterianos e anti-virais (LIU, 2004). Desta forma, levando-se em consideração que as bebidas prebióticas desenvolvidas neste trabalho apresentaram moderada atividade antioxidante *in vitro*, torna-se interessante avaliar a atividade antiproliferativa destas bebidas no crescimento *in vitro* de células de câncer hepático humano (HepG₂). Os resultados destes testes são apresentados nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 – Viabilidade celular relativa (%) de células HepG₂ mediante exposição a diferentes concentrações da Bebida A.

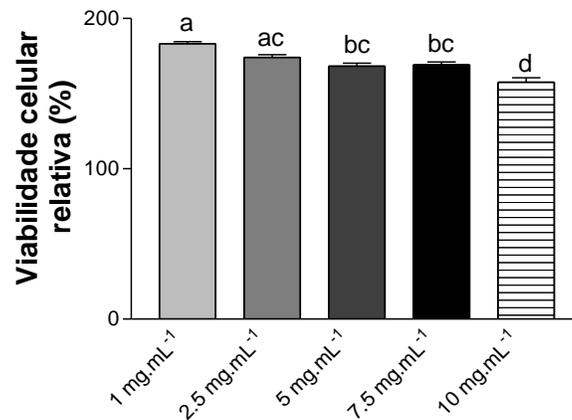
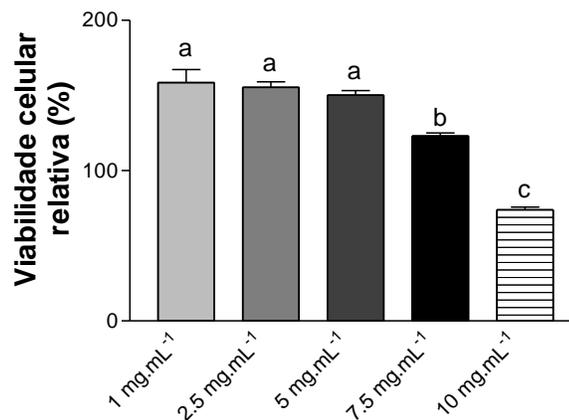


Figura 5 – Viabilidade celular relativa (%) de células HepG₂ mediante exposição a diferentes concentrações da Bebida B.



A atividade antiproliferativa foi expressa como a viabilidade celular relativa (%), após 72 horas de exposição das células à bebida, em que um valor mais baixo indica uma atividade antiproliferativa mais elevada sob as condições experimentais testadas.

A inibição da proliferação de células de câncer pela Bebida B pode ser explicada pelos compostos bioativos presentes no caju e yacon, considerando que estes apresentam consideráveis concentrações de compostos fenólicos, e estes são um dos principais compostos da dieta envolvidos em benefícios a saúde (SUN *et al.*, 2002).

Curiosamente, a bebida prebiótica de caju e yacon (Bebida B) mostrou atividade antiproliferativa em células HepG₂ de modo dose-dependente, enquanto a bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A) foi pouco expressiva quanto a inibição da proliferação das células. Embora a Bebida A tenha apresentado maiores concentrações de polifenóis e atividade antioxidante que a Bebida B, esses resultados sugerem que a atividade antiproliferativa destas bebidas se deve a compostos específicos, ou classe de compostos específicos. Além disso, Sun *et al.* (2002), avaliando a atividade antiproliferativa e antioxidante de frutas como maçã, laranja e abacaxi, mostraram que não houve correlação entre os valores de atividade antioxidante e de atividade antiproliferativa para as frutas analisadas, assim como foi observado no presente trabalho. Desta forma, a atividade antiproferativa verificada nas Bebidas A e B não apresenta relação com a concentração total destes compostos, mas sim, possivelmente, a um grupo de compostos específicos presentes na Bebida B em maiores concentrações que na Bebida A, e esses compostos estariam possivelmente associados ao caju. Porém, a identificação destes compostos específicos e sua relação para a atividade antiproliferativa ainda devem ser investigados.

3.4. CONCLUSÕES

Com relação à aceitação sensorial das bebidas formuladas, conclui-se que a concentração de edulcorante foi determinante na avaliação dos julgadores, enquanto a concentração de extrato de yacon não influenciou significativamente no atributo avaliado. A bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A) apresentou maiores teores de compostos fenólicos, e consequente maior atividade antioxidante que a bebida prebiótica de caju (Bebida B), devido à presença das polpas de acerola, açáí e camu-camu. Porém, a atividade antiproliferativa das bebidas mostrou que não são correlacionadas com a atividade antioxidante e compostos fenólicos, onde a Bebida B apresentou os melhores resultados para inibição do desenvolvimento de células tumorais (HepG₂) em condições *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E. N.; ROLIM, P. M. Potencialidades do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) no diabetes *Mellitus*. **Revista de Ciências Médicas**, v. 20, n. 3/4, 2012.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Food microbiology, nondairy. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p. 304-318, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16^a ed., Gaithersburg, 1995.
- BARONI, S.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 521-530, 2008.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
- BOEING, A. H.; LIBERALI, R.; COUTINHO, V. F. A resposta glicêmica no consumo de yacon (*Smallanthus Sonchifolius*) – revisão sistemática. Glicemia *versus* yacon. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 3, n. 18, p. 513-520, 2012.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008.
- BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, 2001.
- BRASIL. Resolução RDC nº 18, de 30 de abril de 1999 – Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria, 1999.
- BURTON-FREEMAN, B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 3, p. 1-14, 2010.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S.; GARRUTI, D. D. S. Bebida mista com propriedade estimulante à base de água de coco e suco de caju clarificado. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 813-818, 2005.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; FONSECA, A. V. V.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S. Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) tropical juice. **Journal of Food Science and Technology**, DOI 10.1007/s13197-013-1100-1, 2013.

CARVALHO, R. L.; MIRANDA, M. R.; BRASIL, I. M. Avaliação da qualidade, fitoquímicos e atividade antioxidante do suco tropical de caju. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2011.

CHUDA, Y.; SUZUKI, M.; NAGATA, T.; TSUSHIDA, T. Contents and cooking loss of three quinic acid derivatives from garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1437-1439, 1998.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1671–1701, 2011.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. **Bacteriological Analytical Manual**, v. 8, 2002.

FONSECA, A. V. V. **Estabilidade do suco de caju (*Anacardium occidentale*, L.) acondicionado em embalagem de vidro e de pet.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Ceará, 2010.

FREGONESI, B. M.; YOKOSAWA, C. E.; OKADA, I. A.; MASSAFERA, G.; COSTA, T. M. B.; PRADO, S. D. P. T. Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 387-395, 2010.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do Rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do Esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 3-6, 1998.

HORWITZ, W.; LATIMER J. R.; GEORGE, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.** 18. ed. 2005. Current through revision 3, 2010. Gaithersburg: AOAC, 2010. Chapter 45, met. 999.03, p. 96-98.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos.** v. 1, 4 ed. Brasília, 2008.

- JÚNIOR, S.; BAPTISTA, J.; OLIVEIRA, L. S. D. S.; SARDEIRO, F. S.; SOUZA, R. R. D.; LOPES, F. L. G.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURG, E. B. Response surface methodology to evaluation the recovery of amylases by hollow fiber membrane. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 4, p. 713-718, 2007.
- LACHMAN, J.; HAVRLAND, B.; FERNÁNDEZ, E. C.; DUDJAK, J. Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. **Plant Soil and Environment**, v. 50, n. 9, p. 383-390, 2004.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390-1393, 1997.
- LIMA, A.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; SILVA, F. V. G.; FIGUEIREDO, E. A. T. Desenvolvimento de bebida mista à base de água de coco e suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 683-690, 2008.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479-3485, 2004.
- MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L. K. O.; CHAAR, J. M. Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 70-74, 2006.
- MARUTA, Y.; KAWABATA, J.; NIKI, R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2592-2595, 1995.
- MATSUURA, F. C. A. U; ROLIM, R. B. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando à produção de um "blend" com alto teor de vitamina C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 138-141, 2002.
- MEIER, R.; LOCHS, H. Prä-und probiotika. **Therapeutische Umschau**, v. 64, n. 3, p. 161-169, 2007.
- MILLER, N. J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.
- MIURA, T. Antidiabetic activity of *Fucosporia obliqua* and *Smallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. **Journal of Traditional Medicines**, v. 24, n. 2, p. 47-50, 2007.

MIURA, T.; ITOH, Y.; ISHIDA, T. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of the leaf of *Samallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. **Journal of Traditional Medicines**, v. 21, n. 6, p. 275–277, 2004.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PEREIRA, A. C. S. **Desenvolvimento de sucos tropicais mistos com elevada capacidade antioxidante e avaliação *in vivo***. 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PEREIRA, A. C.; DIONÍSIO, A. P.; WURLITZER, N. J.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; BRASIL, I. M.; MANCINI FILHO, J. Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. **Food Chemistry**, v. 157, p. 179-185, 2014.

PEREIRA, A. C.; SIQUEIRA, A. M.; FARIAS, J. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. Desenvolvimento de bebida mista à base de água de coco, polpa de abacaxi e acerola. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 59, n. 4, p. 441-447, 2009.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M. D.; SOUSA, P. H. M. D.; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2006.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R.. Efeitos benéficos do açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 2012.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing / antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

QUINTEROS, E. T. T. **Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de yacon**. 2000. 164 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

REZENDE, S. L.; BERGAMASCO, R.; MACHADO, N. R. C. F.; ANDRADE, C. M. G.; RIBEIRO, R. M.; URIO, H. Purificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni através dos processos com zeólitas e membranas. **Acta Scientiarum Technology**, v. 26, n. 1, p. 21-26, 2004.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}**. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico. 2006a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do Ferro (FRAP)**. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico. 2006b.

RUFINO, M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. D.; MORAIS, S. D.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH⁺**. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, v. 127, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SANCHO, S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; RODRIGUES, S.; SOUSA, P. H. M. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 867-871, 2007.

SILVA, E. B. **Processamento de bebida funcional à base do yacon (*Polymnia sonchifolia* Poepping e Endlicher)**. 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

SILVA, F. V. M.; TAN, E. K.; FARID, M. Bacterial spore inactivation at 45–65° C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. **Food microbiology**, v. 32, n. 1, p. 206-211, 2012.

SILVA, L.; LIMA, A.; MAIA, G.; FIGUEIREDO, R.; SOUSA, P.; LIMA, J. Desenvolvimento de néctares mistos à base de manga e cajá enriquecidos com frutooligossacarídeos ou inulina. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 149-154, 2011.

SILVA, S.; TASSARA, H.. **Frutas Brasil Frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 2005. 324 f.

SOUSA, P. H. M. **Desenvolvimento de néctares mistos de frutas tropicais adicionados de *Ginkgo biloba* e *Panax ginseng***. 2006. 133p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SOUZA-FILHO, M. S. M; LIMA, J. R.; NASSU, R. T.; BORGES, M. F.; MOURA, C. F. Avaliação físico-química e sensorial de néctares de frutas nativas da região Norte e Nordeste do Brasil: estudo exploratório. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, p. 139-143, 2002.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 428 p, 1967.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.

TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research**, v. 20, n. 3, p. 449-459, 2000.

THOMPSON, L. U. Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 5-6, p. 473-497, 1994.

VASCONCELOS, C. M.; SILVA, C. O. D.; TEIXEIRA, L. J. Q.; CHAVES, J. B. P.; MARTINO, H. S. D. 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. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 188-193, 2010.

VIDIGAL, M. C. T. R.; MINIM, V. P. R.; CARVALHO, N. B.; MILAGRES, M. P.; GONCALVES, A. C. A. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic brazilian fruit juices: açai (*Euterpe oleracea* Mart.), camu-camu (*Myrciaria dubia*), cajá (*Spondias lutea* L.) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**, v.44, p.1988-1996, 2011.

YAN, X.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SADA, Y.; NAKANISHI, T.; NAGATA, T. Extraction and Identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4711-4713, 1999.

CAPÍTULO 4: EFEITO HIPOGLICEMIANTE, ANTIOXIDANTE E PREBIÓTICO DE BEBIDAS DE FRUTAS TROPICAIS E YACON EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ALOXANO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos hipoglicemiante, antioxidante e prebiótico de duas bebidas prebióticas, sendo uma mista de frutas tropicais e yacon (Bebida A), e outra composta por caju e yacon (Bebida B). As bebidas foram administradas por gavagem, durante 30 dias, em ratos diabéticos induzidos por aloxano. Ratos Wistar foram divididos em 8 grupos (n = 6), sendo um grupo de animais saudáveis (controle negativo) e um grupo de animais diabéticos (controle positivo), ambos recebendo solução salina, e seis grupos de animais diabéticos recebendo cada uma das bebidas liofilizadas (G3 = 100, G4 = 200 e G5 = 400 mg/kg de peso corpóreo, recebendo a Bebida A; e G6 = 100, G7 = 200 e G8 = 400 mg/kg de peso corpóreo, recebendo a Bebida B). O peso, o consumo da dieta e a glicemia dos animais foram monitorados durante 30 dias. Ao final do experimento os animais foram sacrificados para avaliação da enzima antioxidante do fígado (catalase), e contagem de lactobacilos no material cecal. Os resultados mostraram que o G6 apresentou maior diminuição da glicemia, e aumento da atividade da catalase. Embora os efeitos benéficos também tenham sido verificados no G7 e no G8, o conteúdo de mono e dissacarídeos presentes naturalmente na bebida pode ter influenciado negativamente os resultados de glicemia. Para a atividade da catalase, foi verificado na Bebida A um comportamento dose-dependente nos animais tratados com esta bebida, que pode ser relacionado com o aumento da concentração de compostos antioxidantes provenientes de uma maior ingestão de bebida, sendo a atividade antioxidante diretamente relacionada com a atividade da catalase do fígado dos animais. Um efeito prebiótico dose-dependente foi verificado pelo favorecimento do crescimento de lactobacilos no conteúdo cecal dos animais que receberam a Bebida B.

Palavras-chave: hipoglicemiante, diabetes, catalase, *in vivo*, antioxidante, yacon.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the hypoglycemic, antioxidant and prebiotic effects in two prebiotic drinks: a mixed tropical fruit and yacon, and another consisting of cashew apple and yacon. The drinks were administered by gavage for 30 days in alloxan induced diabetic rats. Wistar rats were divided into 8 groups (n = 6), and a healthy animals group (negative control) and a diabetic animals group (positive control), that ingested saline and six groups of diabetic animals receiving each of beverages lyophilized (G3 = 100, G4 = 200 and G5 = 400 mg / kg body weight, that ingested the beverage A, and G6 = 100, G7 = 200 and = G8 = 400 mg / kg body weight, that ingested the beverage B). The weight, dietary intake and glucose levels were monitored for 30 days. At the end of the experiment the animals were sacrificed to evaluate the liver antioxidant enzyme (catalase), and counts of lactobacilli in cecal material. The results showed that G6 get greater reduction in blood glucose, and increased catalase activity. Although the beneficial effects have also been observed in G7 and G8, the high content of mono and disaccharides naturally present in the beverage A may be affected adversely the results of glucose. The animals treated with beverage A showed a catalase activity at a dose-dependent way, which can be related to the concentration of antioxidant compounds from a greater drink intake, with a directly related behavior between antioxidant and catalase activities of animals liver. A prebiotic dose-dependent effect was observed in growth of lactobacilli in the cecal contents of animals receiving the beverage B.

Keywords: hypoglycemic, diabetes, catalase, in vivo, antioxidant, yacon.

4.1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* é uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países. Nos últimos anos verificou-se o aumento do número de pessoas diabéticas em decorrência das mudanças no estilo de vida que levam ao aumento dos casos de obesidade (SHAW *et al.*, 2010). Devido o aumento da prevalência de obesidade, da inatividade física e de hábitos alimentares inadequados, a diabetes *mellitus* tipo 2 tem sido considerada uma das principais epidemias dos séculos XX e XXI (MELLO; LAAKSONEN, 2009).

Em 2010 o Brasil ocupou a 5ª posição no ranking mundial de incidência de diabetes, apresentando aproximadamente 7,5 milhões de diabéticos com idades entre 20 e 79 anos. O estudo mostrou ainda que a estimativa para o ano de 2030 é que esse número aumente para 12,7 milhões, e que haja cerca de 300 milhões de indivíduos diabéticos no mundo (ZAJDENVERG, 2013; WILD *et al.*, 2004).

Cerca de um terço dos pacientes com diabetes *mellitus* busca tratamentos na medicina alternativa, sendo o yacon bastante consumido por pessoas diabéticas na Bolívia e em outros países em que essa raiz é comumente produzida (OJANSIVU; FERREIRA; SALMIEN, 2011). Algumas frutas tropicais também vêm sendo relatadas por sua ação benéfica no controle glicêmico, com especial destaque para o caju sendo esta ação relacionada principalmente aos seus compostos fenólicos (ABDULLAHI; OLATUNJI, 2010).

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical nativa da América, cuja cultura apresenta grande importância socio-econômica para a região Nordeste do Brasil. O pedúnculo do caju, além de conter açúcares, sais minerais e ácidos orgânicos, apresenta elevado teor de polifenóis, sendo que alguns deles vem sendo associados a propriedades anti-diabéticas e antioxidantes (TEDONG *et al.*, 2010; TREVISAN *et al.*, 2006). Além dos polifenóis presentes no caju, outras frutas tropicais apresentam elevadas concentrações de compostos de natureza fenólica que vem sendo relacionadas a efeitos benéficos em modelos *in vivo*, principalmente àqueles relacionados a atividade antioxidante ou efeito protetor em diferentes tipos de câncer. Um exemplo de efeitos benéficos das frutas tropicais foi recentemente reportado por Pereira *et al.* (2014) e Carvalho-Silva *et al.* (2014), que demonstraram que uma bebida composta de caju, cajá, camu-camu, acerola e açaí apresentou efeitos benéficos quando administradas em animais

saudáveis, apresentando atividade antioxidante e antimutagênica quando administrada em ratos Wistar e camundongos Swiss.

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa utilizada há séculos pelos habitantes de muitas regiões da América do Sul na medicina popular tradicional, e é particularmente reconhecido como uma fonte abundante de fruto-oligossacarídeos (CAMPOS *et al.*, 2012). Estes compostos passam através do estômago e do intestino delgado sem ser absorvidos ou degradados, e chegam intactos ao cólon, onde são fermentados por grupos de bactérias resistentes e promovem a proliferação de bifidobactérias, melhorando assim o equilíbrio intestinal (ROBERFROID *et al.*, 2010). Embora recentemente o yacon tenha se destacado pelos efeitos prebióticos, outro grande interesse desta raiz tem sido focado em suas propriedades antidiabéticas, que vem sendo atribuído não somente ao seu conteúdo de fruto-oligossacarídeos, mas devido aos seus compostos fenólicos, principalmente o ácido clorogênico e seus derivados. Estes compostos estão relacionados à modulação da concentração de insulina no plasma e inibição da gliconeogênese hepática devido à inibição da glicose-6-fosfatase, que catalisa o último passo da glicogenólise e gliconeogênese (OJANSIVU; FERREIRA; SALMIEN, 2011; ARION *et al.*, 1998).

Grande parte do interesse nos benefícios potenciais do yacon e de frutas tropicais relacionados à saúde está relacionado aos seus compostos bioativos, o que tem incentivado alguns pesquisadores a investigar os efeitos *in vitro* e *in vivo* desses alimentos individualmente. Contudo, não há dados na literatura de avaliação dos efeitos de bebidas pasteurizadas do tipo “pronta para beber” compostas por diferentes frutas tropicais e yacon. Esses alimentos, combinados em um mesmo produto, poderiam atuar em diferentes mecanismos para amenizar os problemas relacionados a esta doença crônica-degenerativa de grande importância mundial.

O aloxano é um dos agentes diabetogênicos mais comumente utilizados, por destruir especificamente as células- β das ilhotas de Langerhans, quando em doses adequadas (MÉNDEZ; RAMOS, 1994). O mecanismo de ação em células β do pâncreas é mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS). A ação dos ROS com um grande aumento simultâneo na concentração de cálcio citosólico provoca a destruição rápida das células β (SZKUDELSKI, 2001). Segundo Gorus *et al.* (1982) essa citotoxicidade seletiva do aloxano é condicionada pela grande capacidade da célula- β em acumular a droga, aliada ao fato desta célula demonstrar uma maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparada a outros tecidos.

Diversos são os estudos com o uso de aloxano para indução de diabetes (JEMAI *et al.*, 2009). O aloxano proporciona discreta redução glicêmica cerca de 30 minutos após sua injeção, como resultado de estimulação da secreção de insulina e conseqüente aumento da insulinemia. Contudo, após 60 minutos da injeção ocorre hiperglicemia decorrente de decréscimo da insulinemia persistindo nas 4 horas seguintes, ocorrendo nessa fase as primeiras alterações morfológicas das células β , como dilatação do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias, além de diminuição do complexo de Golgi, dos grânulos e do conteúdo de insulina. No período de 4 a 8 horas ocorre grande aumento da insulinemia, como conseqüência de ruptura da membrana celular. Posterior e permanentemente segue a hiperglicemia, que ocorre de forma crescente entre 9 a 144 horas, estabilizando-se em seguida. Esta fase é alcançada com a completa desgranulação e perda de integridade das células β , ocorrendo aumento da presença de macrófagos no pâncreas (BOQUIST, 1980; SZKUDELKI, 2001; LENZEN, 2008).

Levando em consideração que são escassos os trabalhos relacionando os efeitos benéficos *in vivo* de produtos processados de frutas tropicais prontos para o consumo no Brasil, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito hipoglicemiante, antioxidante e prebiótico da ingestão de duas bebidas de frutas tropicais e yacon através de estudos *in vivo* com ratos Wistar. De acordo com a literatura consultada pelos autores, este é o primeiro estudo sobre um produto composto por essas matérias-primas envolvendo sua relação com efeitos benéficos para a saúde, principalmente aqueles relacionados a diabetes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Formulação das bebidas prebióticas

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) *in natura* e as polpas das frutas utilizadas foram adquiridos no mercado local de Fortaleza-CE. Para preparo do extrato de yacon, a raiz foi processada como descrito no **Capítulo 2**. Ambos os materiais foram armazenados a -18 ± 1 °C antes do uso.

A Bebida A (bebida mista de abacaxi, acerola, açaí, cajá, caju, camu-camu) foi preparada de acordo com o reportado por Pereira *et al.* (2014) e Carvalho-Silva *et al.* (2014), com duas particularidades: adição de extrato de yacon em substituição à água e adição de 0,07% de

esteviosídeo em substituição a sacarose. A Bebida B foi preparada com polpa de caju (50%) e extrato de yacon (50%) adicionados de 0,07% de esteviosídeo. A composição da bebida foi baseada em resultados de análise sensorial realizada por provadores não treinados, e teores de fruto-oligossacarídeos (**Capítulo 3**). Para a pasteurização das bebidas, foi usado um trocador de calor tubular Armfield modelo FT74, sendo a bebida colocada no tanque de alimentação e bombeada através do pasteurizador para alcançar a condição de tratamento (85 °C durante 90 segundos). O envasamento a quente ocorreu logo em seguida. As bebidas foram resfriadas em banho de gelo/água, e armazenadas a -18 ± 1 °C até o momento das análises. As bebidas foram liofilizadas imediatamente após o tratamento térmico e armazenadas a -18 ± 1 °C até o momento do uso.

4.2.2 Animais e delineamento experimental

O trabalho foi iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa no uso de animais da Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG (Protocolo nº 528/2013) – **Anexo 01**. Para o experimento, trinta ratos machos pesando 90 ± 5 g foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em condições padrão de laboratório (temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de 52 ± 5 %, e ciclo de 12 horas de claro-escuro), e alimentados com água e ração *ad libitum* fornecida pelo Biotério Central da UNIFAL-MG, da empresa Nuvilab, cuja composição está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição da ração oferecida aos animais utilizados no experimento (Ração Nuvilab CR1).

Composição	%
Umidade (máx.)	12,50
Proteína Bruta (min.)	22,00
Extrato Etéreo (min.)	5,00
Matéria Mineral (máx.)	10,00
Matéria Fibrosa (máx.)	8,00
Cálcio (máx.)	1,40
Fósforo (min.)	0,60

Composição básica do produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, gordura vegetal, vitamina A, vitamina D3, vitamina B1, vitamina B12, vitamina B2, vitamina B6, vitamina E, vitamina K3, niacina, biotina, ácido fólico, ácido pantotênico, colina, cobre, cobalto, ferro, iodo, manganês, selênio, zinco, lisina e metionina.

Para a indução de diabetes os ratos foram submetidos a um jejum de 8 horas durante a noite, com água *ad libitum* e receberam uma injeção intraperitoneal de aloxano (120 mg/kg). Em seguida, foram alimentados com solução aquosa de sacarose a 10% durante 24 horas. Após quatro dias, a glicemia foi medida e todos os ratos que sofreram indução apresentaram níveis de glicose superiores a 200 mg/dl. As bebidas prebióticas liofilizadas e a solução salina (NaCl a 0,9% para os grupos controle) foram administradas diariamente por gavagem após ressuspensão da amostra (0,5 mL/100 g de peso corporal) durante 30 dias. Os ratos foram distribuídos em oito grupos, com seis animais em cada grupo, sendo:

- Grupo 1 – Controle negativo: Animais saudáveis tratados com solução salina (NaCl 0,9%).
- Grupo 2 – Controle positivo: Animais diabéticos tratados com solução salina (NaCl 0,9%).
- Grupo 3: Animais diabéticos tratados com 100 mg/kg (peso corpóreo) de bebida A.
- Grupo 4: Animais diabéticos tratados com 200 mg/kg (peso corpóreo) de bebida A.
- Grupo 5: Animais diabéticos tratados com 400 mg/kg (peso corpóreo) de bebida A.
- Grupo 6: Animais diabéticos tratados com 100 mg/kg (peso corpóreo) de bebida B.
- Grupo 7: Animais diabéticos tratados com 200 mg/kg (peso corpóreo) de bebida B.
- Grupo 8: Animais diabéticos tratados com 400 mg/kg (peso corpóreo) de bebida B.

Os parâmetros nutricionais de ganho de peso e consumo da dieta foram coletados três vezes por semana. Os níveis de glicose no sangue foram medidos a cada três dias, totalizando 10 medições. Após 30 dias, os animais foram anestesiados por inalação utilizando halotano (2 L/min) e sacrificados por extração de sangue a partir da aorta abdominal com uma seringa. O soro foi obtido por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 minutos, e o fígado lavado por perfusão com solução salina (0,9 % p/v), e imediatamente congelado a -80 °C.

4.2.3 Atividade da catalase do fígado

A atividade da catalase (CAT) foi medida no tecido do fígado dos animais. A análise foi realizada com uso de método baseado na redução do H_2O_2 10 mM. A decomposição de H_2O_2 pela CAT contida nas amostras apresenta uma cinética de primeira ordem e as alterações na absorbância foram medidas após a adição de H_2O_2 , e em seguida, em intervalos de 10 segundos, durante 60 segundos (HUGO; LESTER, 1984).

4.2.4 Determinação de lactobacilos no material cecal

Uma amostra de 1 g de conteúdo cecal foi transferida para um tubo estéril, misturada com 9 mL de solução estéril de tampão fosfato salino (PBS, Sigma Aldrich) e, em seguida, diluídas em série (de 10^{-1} a 10^{-7}) em um meio de ágar Rogosa SL. A incubação foi realizada a 35°C , sob condições anaeróbias, utilizando o frasco anaeróbio Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemanha). O número de células foi fixado como \log_{10} ufc/g de matéria fresca após 48h de incubação.

4.2.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 4.0 para Windows (San Diego, CA, EUA), efetuando-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($P < 0,05$) entre as médias.

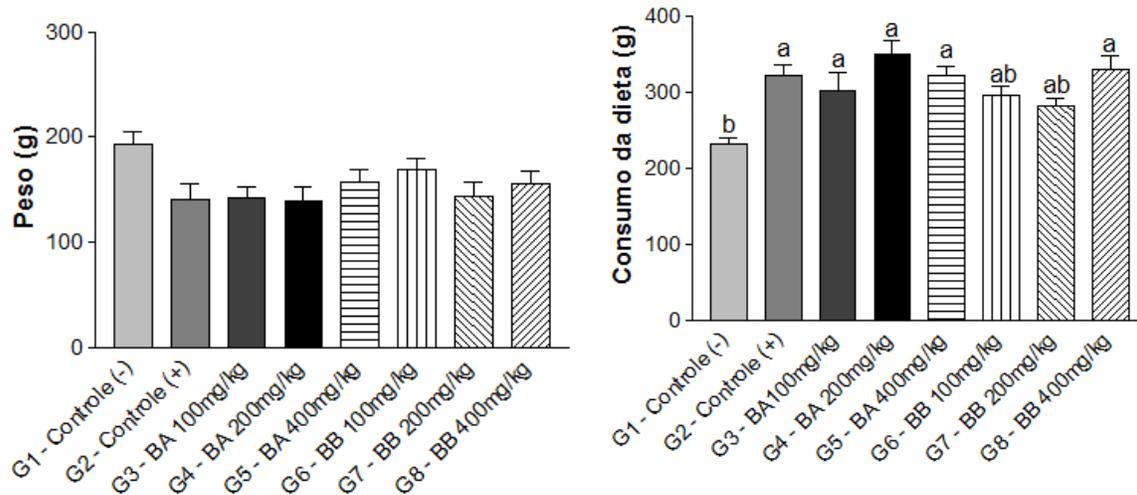
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Parâmetros nutricionais avaliados nos ratos induzidos ao diabetes

No presente experimento, os ratos diabéticos induzidos por aloxano apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) no consumo de ração quando comparados aos ratos saudáveis

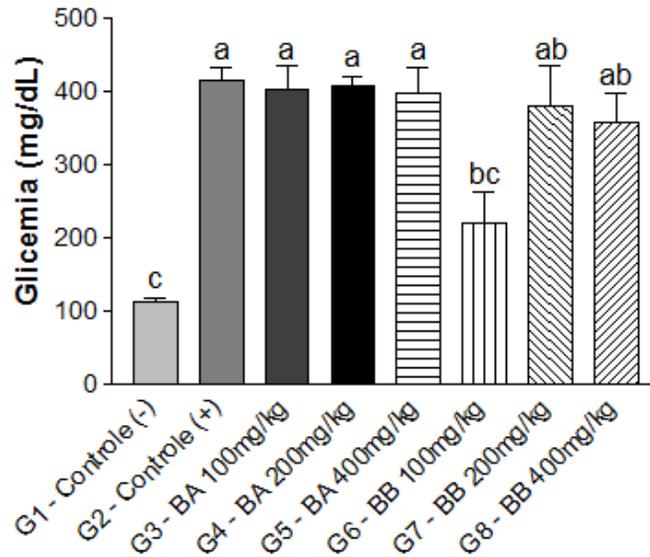
(controle negativo); porém não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos testados com diferentes concentrações das bebidas prebióticas, quando comparados com o controle positivo. No entanto, embora todos os grupos tenham apresentado ganho de peso corporal inferior quando comparadas ao grupo controle negativo (não-diabético), esse ganho de peso não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$) (Figura 1).

Figura 1 – Ganho de peso e consumo de dieta dos diferentes grupos experimentais.



Ambas as bebidas prebióticas apresentaram cerca de 88% de umidade (**Capítulo 3 – Tabela 7**). Desta forma, 100 mg do material liofilizado corresponderam a cerca de 25 mg e 19,3 mg de fruto-oligosacarídeos, para as Bebidas A e B, respectivamente. Curiosamente, os dados apresentados neste estudo demonstraram que a administração da Bebida B em sua menor concentração (G6 = 100 mg/kg de peso corporal) durante 30 dias causou uma diminuição significativa nos níveis de glicose no sangue ($P < 0,05$) quando comparados com ratos diabéticos não tratados (controle positivo). Apesar de não haver diferença estatística ($P > 0,05$) para os tratamentos que receberam a bebida prebiótica (G6, G7 e G8), o grupo G6 apresentou os valores mais baixos de níveis de glicose no sangue (Figura 2).

Figura 2 – Glicemia dos animais durante o período experimental.



A Bebida B apresentou uma concentração considerável de monossacarídeos (**Capítulo 3 – Tabela 8**), o que pode ter influenciado negativamente o controle da glicemia dos animais G7 e G8, que ingeriram maiores concentrações da Bebida B, quando comparados aos animais G6. O efeito hipoglicemiante dessa bebida pode ser atribuído a uma combinação de diferentes compostos funcionais, como FOS e componentes fenólicos, encontrados no caju e no yacon. Estes compostos podem atuar de forma distinta, em diferentes mecanismos envolvidos no diabetes. Os fruto-oligosacarídeos são metabolizados pela microbiota do cólon, e os produtos finais da fermentação de carboidratos são ácidos graxos de cadeia curta, tais como acetato, propionato e butirato. Estes compostos produzidos durante a fermentação são prontamente absorvidos pela mucosa do cólon. Sabe-se que o butirato serve como combustível para a mucosa, ao passo que o propionato, ao entrar na circulação sanguínea pode influenciar no metabolismo de lipídeos e carboidratos (ALLES *et al.*, 1999). Por sua vez, os polifenóis encontrados no yacon podem inibir a glicose-6-fosfatase hepática, a enzima que catalisa a reação terminal da glicogenólise e gliconeogênese, as duas vias de produção de glicose no fígado de seres humanos e animais superiores, e os polifenóis encontrados no caju podem ter efeito sobre a captação de glicose nas células do músculo esquelético, possivelmente através da ativação da adenosina-monofosfato de proteína quinase – AMPK (TEDONG *et al.*, 2010; ARION *et al.*, 1998). Além disso, estudos (BRITO *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2006) mostraram que polifenóis e flavonóides têm ação antioxidante, e Salam *et al.*, (2008) mostrou que alguns flavonóides

isolados a partir de plantas podem atuar como agentes anti-diabéticos pela ação seletiva nos receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo gama (PPAR- γ), um receptor nuclear que desempenha um papel essencial na resistência à insulina e síndrome metabólica (ABDULLAHI; OLATUNJI, 2010).

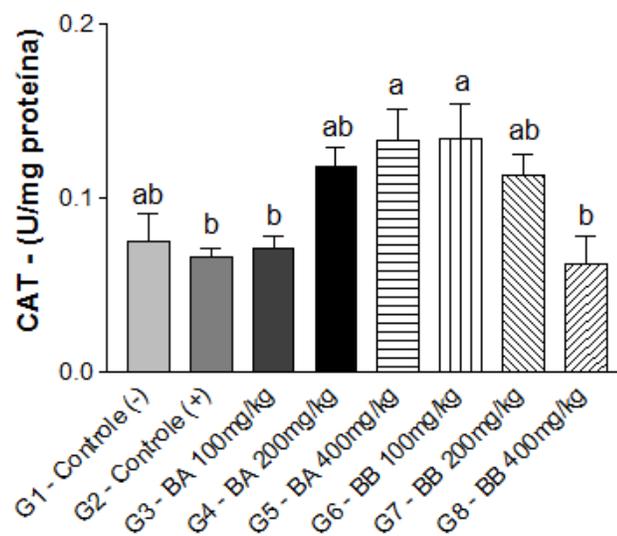
Diversos são os trabalhos encontrados na literatura que mostram os efeitos benéficos da ingestão de yacon e de caju. Aybar *et al.* (2001) obtiveram que ratos diabéticos tratados com chá de folhas de yacon durante 30 dias apresentaram uma redução de aproximadamente 50% nos níveis de glicose séricos. Abdullahi; Olatunji (2010) verificaram uma redução nos níveis séricos de glicose em ratos tratados com extrato de casca de cajueiro. Esse efeito hipoglicemiante foi atribuído à presença de compostos fenólicos e flavonóides presentes no extrato da casca do cajueiro, indicando assim que o presente estudo obteve resultados semelhantes aos encontrados na literatura. Além disso, Domínguez *et al.* (2012), em estudo sobre os efeitos do consumo de uma bebida de caju sobre a resposta glicêmica em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, obtiveram resultados que evidenciaram uma redução da reposta glicêmica pós-prandial com o consumo da bebida estudada (de 207 para 181 mg/dL em 60 min), o que sugere que o caju possui propriedades hipoglicemiantes, indicando que uma bebida elaborada com caju pode ser uma alternativa para indivíduos diabéticos.

Como mencionado anteriormente, o diabetes *mellitus* está associado à produção de espécies reativas de oxigênio, que levam a danos oxidativos particularmente no fígado e nos rins. O estresse oxidativo no diabetes ocorre com uma diminuição da capacidade antioxidante, o que pode aumentar os efeitos deletérios de radicais livres. Os antioxidantes desempenham um papel importante na proteção de sistemas biológicos contra as espécies reativas de oxigênio, e dentre os componentes do sistema de defesa que evoluíram para reduzir a lesão de ataque de radicais livres, incluem-se várias enzimas e algumas moléculas que captam radicais livres. A catalase (CAT) é uma hemoproteína que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e protege os tecidos dos radicais hidroxila extremamente reativos (KAKKAR *et al.*, 1998; PICTON; FLATT; MCCLENGHAN, 2001; VENDEMIALE; GRATTAGLIANO; ALTOMARE, 1999; SEARLE; WILLSON, 1980) No presente experimento observamos uma diminuição, embora sem significância estatística ($P > 0,05$) na atividade da CAT no fígado de animais diabéticos quando comparados aos não-diabéticos (Figura 3). Porém, a administração da Bebida B ao grupo G6 durante 30 dias causou um aumento significativo na atividade da enzima antioxidante e uma

diminuição da glicemia quando comparados ao controle positivo (G2). Esse aumento da atividade da enzima antioxidante catalase sinaliza a possibilidade de que esta bebida, principalmente nesta concentração, pode reduzir o potencial de glicação de enzimas, ou então pode reduzir os radicais livres e espécies reativas de oxigênio.

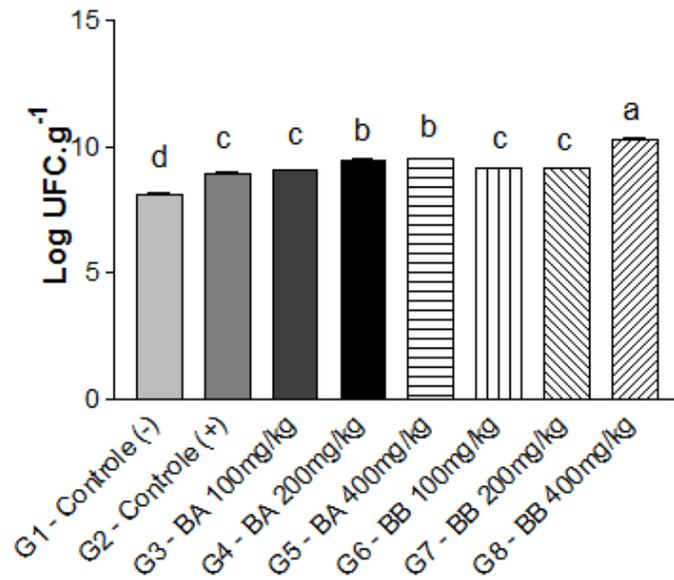
Os mecanismos propostos pela atividade da catalase são diferenciados: uma maior atividade da enzima encontrada no G6 estaria indiretamente relacionada com a ingestão da Bebida B, uma vez que esse grupo teve um melhor controle na glicemia dos animais. Por sua vez, o aumento dose-dependente da atividade da catalase nos animais que receberam a Bebida A pode ser relacionada, de uma forma direta, com o aumento da concentração de compostos antioxidantes provenientes de uma maior ingestão da bebida (G3 < G4 < G5), sendo a atividade antioxidante diretamente relacionada com a atividade da catalase do fígado dos animais. Schmatz (2011) observou uma redução da atividade da CAT em fígados de ratos diabéticos, sustentando a ocorrência do estresse oxidativo em animais com essa patologia, ao passo que o tratamento com resveratrol teve efeito protetor contra os danos oxidativos no fígado dos animais tratados, prevenindo a diminuição do sistema de defesa antioxidante enzimático, e esse efeito foi relacionado à atividade antioxidante do resveratrol. Assim, os resultados encontrados no presente trabalho estão em acordo com a literatura.

Figura 3 – Atividade da catalase nos fígados dos animais.



Os resultados da análise microbiológica do material cecal são apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Quantificação de lactobacilos no material cecal dos animais.



Os resultados apresentados na Figura 4 mostram um efeito dose-dependente do consumo da bebida prebiótica de caju e yacon, e o desenvolvimento de lactobacilos, identificados no material cecal dos animais. As concentrações de lactobacilos (\log_{10} ufc/g de amostra fresca) foram significativamente mais elevadas ($P < 0,05$) nos animais diabéticos que receberam a bebida por meio de gavagem, quando comparados com os grupos controle, que receberam apenas solução salina. A quantificação de lactobacilos no conteúdo cecal foi maior nos animais que receberam a maior concentração de bebida prebiótica ($G6 \leq G7 < G8$), devido, conseqüentemente, a maior quantidade de FOS neste tratamento. Neste caso, o efeito foi dose-dependente, pois, diferente dos resultados de glicemia, uma maior concentração de mono e dissacarídeos oriundos da maior dosagem de bebida administrada não teve influência negativa neste parâmetro analisado. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, que mostram que FOS provenientes do yacon são eficientemente metabolizados pelos lactobacilos *in vitro* e *in vivo*, utilizando um modelo de ratos (PEDRESCHI *et al.*, 2003; BIBAS BONET *et al.*, 2010).

4.4 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a bebida prebiótica de caju e yacon (Bebida B) promoveu o crescimento de lactobacilos no material cecal dos animais que consumiram essa bebida, além de ter aumentado a atividade da enzima catalase no fígado dos animais de uma forma dose-dependente. Para a atividade da catalase, foi verificado na Bebida A um comportamento dose-dependente nos animais tratados com essa bebida, que pode ser diretamente relacionado com o aumento da concentração de compostos antioxidantes provenientes de uma maior ingestão de bebida, sendo a atividade antioxidante diretamente relacionada com a atividade da catalase do fígado dos animais. Um efeito prebiótico dose-dependente foi verificado pelo favorecimento do crescimento de lactobacilos no conteúdo cecal dos animais que receberam a Bebida B.

Além disso, os animais tratados com a Bebida B em sua menor concentração (G6 = 100 mg/kg de peso corporal) apresentaram significativa diminuição nos níveis de glicose no sangue quando comparados com ratos diabéticos não tratados. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, sugere-se que a bebida de yacon e caju deve ser considerada como uma alternativa para futuros estudos sobre a diabetes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O tratamento do yacon com os ácidos estudados (ascórbico e cítrico) foi otimizado visando a inativação da enzima polifenoloxidase, sendo as condições ótimas: concentração de ácido ascórbico de 4,0 a 4,6% com tempo de imersão de 1 a 2 minutos; ou concentração de ácido cítrico de 2,4 a 4% durante 8,5 a 9 minutos.
- Ambos os tratamentos foram adequados para o processo, pois além de terem inativado a enzima estudada, não diminuíram expressivamente os teores de FOS, tornando viável o tratamento enzimático do yacon com ácido cítrico e ascórbico, nas concentrações e tempos otimizados.
- A concentração de edulcorante foi determinante na avaliação sensorial de aceitação das bebidas, enquanto que a concentração de extrato de yacon não influenciou significativamente no atributo avaliado.
- A bebida prebiótica de frutas tropicais e yacon (Bebida A) apresentou maiores teores de compostos fenólicos, e conseqüente maior atividade antioxidante que a bebida prebiótica de caju (Bebida B), devido a presença das polpas de acerola, açai e camu-camu. Por outro lado, a Bebida B apresentou os melhores resultados para inibição do desenvolvimento de células tumorais (HepG₂) em condições *in vitro*, o que indica, neste caso, que a atividade antiproliferativa não apresentou correlação direta com a atividade antioxidante e compostos fenólicos.
- A bebida prebiótica de caju e yacon (Bebida B) promoveu o crescimento de lactobacilos no material cecal dos animais que consumiram essa bebida, além de ter aumentado a atividade da enzima catalase no fígado dos animais de uma forma dose-dependente.
- Os animais tratados com a Bebida A apresentaram um comportamento dose-dependente para a atividade da catalase, que pode ser diretamente relacionado com o aumento da concentração de compostos antioxidantes provenientes de uma maior ingestão de bebida, sendo a atividade antioxidante diretamente relacionada com a atividade da catalase do fígado dos animais.
- Os animais tratados com a Bebida B em sua menor concentração (G6 = 100 mg/kg de peso corporal) apresentaram significativa diminuição nos níveis de glicose no sangue ($P < 0,05$) quando comparados com ratos diabéticos não tratados

- O efeito hipoglicemiante da Bebida B pode ser atribuído a uma combinação de diferentes compostos funcionais, como FOS e componentes fenólicos, encontrados no caju e no yacon. Estes compostos podem atuar de forma distinta, em diferentes mecanismos envolvidos no diabetes
- Diante disso, sugere-se que a bebida de yacon e caju deve ser considerada como uma alternativa para futuros estudos sobre a diabetes.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, S.; OLATUNJI, G. A. Antidiabetic activity of *anacardium occidentale* in alloxan-diabetic rats. **Journal of Science and Technology (Ghana)**, v. 30, n. 3, p. 35-41, 2010.
- ALLES, M. S.; HARTEMINK, R.; MEYBOOM, S.; HARRYVAN, J. L.; VAN LAERE, K. M.; NAGENGAST, F. M.; HAUTVAST, J. G. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 980-991, 1999.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 33, n. 1, p. 62-69, 2010.
- ARION, W. J.; ARION, W. J.; CANFIELD, W. K.; RAMOS, F. C.; SU, M. L.; BURGER, H. J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P.; HERLING, A. W. Chlorogenic acid analogue S 3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 351, n. 2, p. 279-285, 1998.
- AYBAR, M.; SANCHEZ RIERA, A.; GRAU, A.; SANCHEZ, S. Hypoglycemic effect of the water extracts of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 125-132, 2001.
- BIBAS BONET, M. E.; MESON, O.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; DOGI, C. A.; CHAVES, S.; KORTSARZ, A.; GRAU, A.; PERDIGÓN, G. Prebiotic effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on intestinal mucosa using a mouse model. **Food and Agricultural Immunology**, v. 21, n. 2, p. 175-189, 2010.
- BOQUIST, L. A new hypothesis for alloxan diabetes. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology**, v. 88, n. 1-6, p. 201-209, 1980.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm Acesso em: 20/12/2013.
- BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; LIN, L. Z.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118, 2007.
- CAMPOS, D.; PALLARDEL-BETALLELUZ, I.; CHIRINOS, R.; AGUILAR-GALVEZ, A.; NORATTO, G.; PEDRESCHI, R. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and Phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, 1592-1599, 2012.

CARVALHO-SILVA, L. B.; DIONÍSIO, A. P.; PEREIRA, A. C. S.; WURLITZER, N. J.; BRITO, E. S.; BATAGLION, G. A.; BRASIL, I. M.; EBERLIN, M. N.; LIU, R. H. Antiproliferative, antimutagenic and antioxidant activities of a Brazilian tropical fruit juice. **LWT-Food Science and Technology**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.002>

DOMÍNGUEZ, R. M. J.; HENRÍQUEZ, A. R. B.; SINTJAGO, E. A. M.; FERRER, E. K. E. Effects of consumption of a cashew drink (*Anacardium occidentale*) on glucose-insulin response in patients with type 2 diabetes *mellitus*. **Perspectivas en Nutrición Humana**, v. 14, n. 1, p. 11-21, 2012.

GORUS, F. K.; MALAISSE, W. J.; PIPELEERS, D. G. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. **Biochemical Journal**, v. 208, n. 2, p. 513-515, 1982.

HUGO, A.; LESTER, P. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126. (1984).

JEMAI, H.; EL FEKI, A.; SAYADI, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8798-8804, 2009.

KAKKAR, R.; MANTHA, S. V.; RADHI, J.; PRASAD, K.; KALRA, J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin induced diabetes. **Clinical Science**, v. 94, n. 6, p. 623- 632, 1998.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

MELLO, V. D.; LAAKSONEN, D. E. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 509-18, 2009.

MÉNDEZ, J. D.; RAMOS, H. G. Animal models in diabetes research. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 4, p. 367-375, 1994.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C. L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 40-46, 2011.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 5278-5284, 2003.

PEREIRA, A. C. D. S.; DIONÍSIO, A. P.; WURLITZER, N. J.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. D.; BRASIL, I. M.; MANCINI FILHO, J. Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. **Food Chemistry**, v. 157, p. 179-185, 2014.

PICTON, S. F.; FLATT, P. R.; MCCLENGHAN, N. H. Differential acute and long term actions of succinic acid monomethyl ester exposure on insulin secreting BRAIN-BD 11 cell.

International Journal of Experimental Diabetes Research, v. 2, n. 1, p. 19–27, 2001.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M.; LÉOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N.; CANI, P.; NEYRINCK, A.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 2, p. 1-63, 2010.

SALAM, N. K.; HUANG, T. H. W.; KOTA, B. P.; KIM, M. S., LI, Y.; HIBBS, D. E. Novel PPAR-gamma Agonists Identified from a Natural Product Library: A Virtual Screening, Induced-Fit Docking and Biological Assay Study. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 71, n. 1, p. 57-70, 2008.

SCHMATZ, R. **Efeitos do resveratrol do suco de uva e do vinho tinto nos biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de ectoenzimas em ratos diabéticos**. 2011. 144 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica), Univerisdade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SEARLE, A. J.; WILLSON, R. L. Glutathione peroxidase: effect of superoxide, hydroxyl and bromine free radicals on enzyme activity. **International Journal of Radiation Biology**, v. 37, v. 2, p. 213-217, 1980.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 1, p. 4-14, 2010.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TEDONG, L.; MADIRAJU, P.; MARTINEAU, L. C.; VALLERAND, D.; ARNASON, J. T.; DESIRE, D. D.; LAVOIE, L.; Kamtchouing, P.; Haddad, P. S. Hydro-ethanolic extract of cashew tree (*Anacardium occidentale*) nut and its principal compound, anacardic acid, stimulate glucose uptake in C2C12 muscle cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 12, p. 1753-1762, 2010.

TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale* L.) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

VALENTOVÁ, K.; STEJSKAL, D.; BARTEK, J.; DVOŘÁČKOVÁ, S.; KŘEN, V.; ULRICHOVÁ, J.; ŠIMÁNEK, V. Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: *In vivo* safety assessment. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 3, p. 1006-1013, 2008.

VENDEMIALE, G.; GRATTAGLIANO, I.; ALTOMARE, E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 29, n. 2, p. 49-55, 1999.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H.; MESQUITA, M. K. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 2004.

ZAJDENVERG, L. Diabetes *mellitus*: um problema de saúde pública. Disponível em: http://www.alerj.rj.gov.br/common/noticia_corpo.asp?num=40854. Acesso em 08/12/2013

Anexo 01: Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNIFAL/MG) para realização dos ensaios com animais de laboratório.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 11 de setembro de 2013.

Prof. Luciano Bruno de Carvalho Silva

Prezado Professor,

O projeto sob sua coordenação, registro nº 528/2013, intitulado “Desenvolvimento de bebidas mistas de frutas tropicais e yacon como fonte de oligossacarídeos prebióticos” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG