



DINA LUZ HERNÁNDEZ TORRES

Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*) por quatro linhagens probióticas.

LAVRAS – MG

2019

DINA LUZ HERNÁNDEZ TORRES

Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*) por quatro linhagens probióticas.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em microbiologia e processos fermentativos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr Luiz Roberto Batista

Coorientadora

Dra. Olga Lucía Mondragón-Bernal

LAVRAS – MG

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Hernández-Torres, Dina Luz.

Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de
farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*)
por quatro linhagens probióticas. / Dina Luz Hernández-Torres. -
2019.

80 p.

Orientador (a): Luiz Roberto Batista.

Coorientador (a): Olga Lucia Mondragón-Bernal.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Probióticos. 2. Delineamento composto rotacional (DCCR).
3. Adesão microbiana. I. Batista, Luiz Roberto. II. Mondragón-
Bernal, Olga Lucia. III. Título.

DINA LUZ HERNÁNDEZ TORRES

Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*) por quatro linhagens probióticas.

Kinetics, formulation and functionality of yacon (*S. sonchifolius*) and peanut (*Arachis hypogae L.*) fermented by four probiotic strains.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em microbiologia e processos fermentativos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves UFLA

Dr. Bernardo Onagar Yépez Silva INMETRO

Dr. Luiz Roberto Batista

Orientador

Prof. Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal

Coorientadora

LAVRAS – MG

2019

*Dedico este trabalho a Deus todo poderoso, aos meus pais
Júlio Cesar Hernández e Bertha Torres, a minha irmã Clara Hernández
e a minha amiga Jessica Santana.*

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiro que tudo pela concretização de mais um sonho.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Luis Roberto Batista por sua orientação e dedicação

Ao professor Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves e à professora Olga Lucia Mondragón Bernal pela orientação, paciência, dedicação, ensinamentos e amizade, que foram de grande relevância para a realização deste trabalho.

À funcionária do Departamento de Ciência dos Alimentos, Creuza pela amizade e ajuda na realização dos experimentos.

À todos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, em especial a Moisés e a Bic júnior Eduarda pela amizade, companheirismo e pela enorme ajuda que tive durante a condução de todo o experimento.

Ao pessoal do Núcleo de Estudos de Engenharia de Bioprocessos, pela amizade e oportunidades que foram importantes no meu crescimento interpessoal e profissional, em especial a Debora, Isabella e Cristiano que sempre estavam para dar uma palavra de apoio.

À todos os amigos que tive o privilégio de conhecer durante o período do mestrado, em especial a Ana Cristina, Laís, Amanda, Luiza e Vanessa pela amizade, conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Em especial agradeço o amor incondicional e a confiança depositada em mim, pelos meus pais, Júlio Hernández e Bertha Torres e ao companheirismo, amizade, ajuda e apoio de minha irmã Clara Hernández e meus amigos Matheus Siqueira e em especial de minha querida Jessica Regina Santana Silva que seu apoio, dedicação e conselhos foram essenciais nessa caminhada.

Muito obrigada

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘por que não?’” (George Bernard Shaw)

RESUMO GERAL

O consumo de alimentos funcionais vem aumentando muito nos últimos anos, já que o consumidor quer produtos que adicionem benefícios à sua saúde. Dentro dos alimentos funcionais, encontram-se os probióticos e as fibras prebióticas. Além disso, o número crescente de consumidores veganos aumenta a demanda por alimentos probióticos fermentados alternativos de origem não láctea. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da concentração de farinha de yacon (FY) e de farinha de amendoim (FA) na produção e funcionalidade de uma bebida fermentada simbiótica, visando obter um produto que atenda às legislações vigentes com respeito à concentração celular. Para isso foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 2 variáveis independentes (concentrações de FY e FA) totalizando 13 tratamentos, tendo como variáveis resposta crescimento celular, acidez, pH e consumo de açúcares redutores. Os experimentos foram realizados em tubos de centrífuga contendo meios previamente esterilizados com diferentes concentrações de FY e FA, que foram inoculados com cultura mista de *Lactobacillus rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus* (LA14), *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (LBC81) e *Bifidobactéria longum* (BL04). Foram realizados testes de funcionalidade dos microrganismos puros, em cultura mixta e de duas bebidas fermentadas. Os tratamentos referentes ao ponto central com 6% FY e 7% FA, apresentaram os maiores fatores de crescimento total (1,55%). Já o tratamento 6, com 12% FY e 7% FA apresentou a maior produção de ácido lático (10,3 g ácido lact/L) e o maior consumo de açúcares redutores e açúcares redutores totais (20,9 e 20,7 g/L respectivamente). A melhor condição de fermentação para a produção de um simbiótico a base de Farinha de yacon e Farinha de amendoim em termos de crescimento celular foi obtida com a formulação contendo 7% FY e 7% FA. O valor de hidrofobicidade para a bebida (60,8%) foi maior que o das cepas puras e o inoculo, a BL04 apresentou o maior porcentagem de autoagregação (61,3%) e o inoculo o maior porcentagem de co-agregação (61,23%), características positivas da funcionalidade probiótica quanto a aderência ao Tecido Linfoide Associado ao Intestino (GALT). Os protótipos desenvolvidos neste estudo apresentaram contagens probióticas em números elevados e dentro das exigências legais.

Palavras chaves: adesão microbiana, Delineamento composto central rotacional (DCCR), *Lactobacillus spp. rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus* (LA14), *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (LBC81) e *Bifidobacterium longum* (BL04).

GENERAL ABSTRACT

The consumption of functional foods is increasing, since the consumer wants products that add benefits to his health. Within these functional foods, we find probiotics and prebiotic fibers. In addition, increasing numbers of 'vegan' consumers show demand for alternative fermented probiotic foods of non-dairy origin. The objective of this work was to evaluate the concentration of yacon flour (FY) and peanut flour (FA) in the production and functionality of a symbiotic fermented drink, in order to obtain a product that complies with current legislation. For this purpose, the central composite rotational design (CCRD) was used to evaluate the effects of FY (% m / v) and FA (% m / v) on cell growth, acidity, pH and reducing sugars consumption. The treatments referring to the central point with 6% FY and 7% FA, presented the highest total growth factors (1.55%). On the other hand, treatment 6 with 12% FY and 7% FA presented the highest production of lactic acid (10.27 lactate / L) and the highest consumption of reducing sugars and total reducing sugars (20.87 and 20.66 respectively) . The DCCR was effective to analyze the best fermentation conditions for the production of a symbiotic yacon Flour and Peanut Flour. The functionality tests showed higher values of hydrophobicity (60.8%) and autoaggregation (67.2%) than pure and mixed inoculum (without addition of substrates), a positive feature of probiotic functionality in adherence to Associated Lymphoid Tissue to the Intestine (GALT). And the substrates showed a protective effect on the probiotic agents when obtaining final counts of the drink above 6 logUFC / mL, required by Brazilian legislation.

Keywords: Microbial adhesion, central composite rotational design (CCRD), *Lactobacillus spp. rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus* (LA14), *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (LBC81) e *Bifidobacterium longum* (BL04).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Mecanismo de ação de agentes probióticos.....	20
Figura 1-2. Ação das forças atrativas de hidrofobicidade na aderência dos agentes probióticos ao epitélio intestinal.....	22
Figura 1-3. Esquema da conversão de glicose em ácido láctico.	26
Figura 1-4. Esquema do processo metabólico da fermentação de açúcares nas bactérias do ácido láctico.	27
Figura 2-1. Curvas de contorno para o FCCT (fator de Crescimento para Contagem Total) em relação às variáveis %FY e %FA (a), FCCB (fator de Crescimento para Contagem de bifidobactérias) em relação às variáveis %FY e %FA (b), Cons. Açúcares redutores (AR) com respeito ao %FY e %FA (c) e Cons. Açúcares redutores totais (ART) com respeito ao %FY e %FA (d).	60
Figura 2-2. Contagem Total Log UFC/mL em relação ao tempo (A), crescimento de lactobacilos em 6 horas de fermentação (B) e crescimento de bifidobactérias em 6 horas (C).	65
Figura 2-3. Cinética de acidez titulável (g ácido láctico/L) durante a fermentação para cada tratamento do DCCR.	66
Figura 2-4. Variação do pH do meio durante a fermentação para os tratamentos do DCCR.	66
Figura 2-5. Cinética de consumo de açúcares redutores (AR)(g/L) durante a fermentação para cada tratamento do DCCR.	67
Figura 2-6. Cinética de consumo de açúcares redutores totais (ART)(g/L) durante a fermentação para cada tratamento do DCCR.	67
Figura 2-7. Porcentagem de Hidrofobicidade (%H) das linhagens puras de LR (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR32), LBC (<i>Lactobacillus paracasei</i> supsp <i>paracasei</i> . LBC81), BL (<i>Bifidobacterium longum</i> BL04), LA (<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14), do inoculo da mistura de LR:LBC:LA (<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14), do inoculo da mistura de LR:LBC:LA:BL na proporção de 10:15:15:60, e da bebida fermentada contendo 7%FY e 7 %FA.....	71
Figura 2-8. Porcentual de autoagregação (%A) do LR32, LA14, BL04, LBC81, o inoculo misto na proporção de 10:15:15:60, e da bebida fermentada contendo 7%FY e 7 %FA (a) e porcentual de co-agregação do inoculo na proporção de 10:15:15:60, e da bebida fermentada contendo 7%FY e 7 %FA (b).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1. Composição química da farinha de yacon (g/100g).....	24
Tabela 2-1. Delineamento experimental DCCR para fermentado simbiótico elaborado com farinhas de yacon e amendoim.	45
Tabela 2-2. Concentração dos ácidos orgânicos.....	48
Tabela 2-3. Volumes para preparo dos mix, a partir de soluções a 10g/L.	49
Tabela 2-4. Resultados obtidos para contagens dos probióticos nos meios com farinhas de yacon e amendoim, de acordo com DCCR.	54
Tabela 2-5. Resultados obtidos para pH, produção de ácido láctico, consumo de AR e ART na fermentação láctica de meio contendo farinhas de yacon e amendoim por linhagens probióticas segundo delineamento experimental DCCR.....	55
Tabela 2-6. Coeficientes de regressão e p- valor associados para o FCCT, FCCL e FCCB...	56
Tabela 2-7. Coeficientes de regressão e p- valor associados para o pH, a produção de ácidos e o consumo de açúcares redutores.	57
Tabela 2-8. Análise de variância para o fator de crescimento da contagem total de probióticos (FCCT), o fator de crescimento da contagem de bifidobactérias (FCCB), para o consumo de açúcares redutores (Cons. AR), e o consumo de açúcares redutores totais (Cons. ART).....	58
Tabela 2-9. Resultados da validação dos modelos para fator de crescimento para contagem total, fator de crescimento para bifidobactérias (FCCT) e para consumo de açúcares redutores	62
Tabela 2-10. Concentrações dos ácidos no tempo inicial e final da fermentação expressados em g/L.....	68
Tabela 2-11. Resultados do teste de resistência às condições simuladas do trato digestório humana durante 8 h de digestão.	70

SUMÁRIO

Capitulo I.....	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Alimentos Funcionais.....	17
2.2. Probióticos.....	17
2.3. Testes de Funcionalidade.....	20
2.4. Adesão Microbiana	21
2.5. Yacon.....	23
2.6. Amendoim	24
2.7. Fermentação Láctica.....	25
2.8. Fermentação De Extratos Vegetais Com Probióticos	27
2.9. Planejamento experimental.....	28
3. REFERENCIAS	31
Capitulo II- ARTIGO	38
RESUMO	39
ABSTRAC	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1. Ativação e propagação dos microrganismos liofilizados	44
2.2. Preparo do inóculo	45
2.3. Planejamento experimental.....	45
2.4. Fermentação	45
2.5. Análise estatística	46
2.6. Validação do modelo	46
2.7. Contagem padrão de bactérias probióticas	47
2.8. Medição do pH e acidez titulável	47
2.9. Determinação de açúcares redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)	47
2.10. Determinação de ácidos orgânicos.....	48
2.11. Testes <i>in vitro</i> de resistência de probióticos às condições simuladas do trato Digestório humano	50
2.12. Teste de hidrofobicidade.....	51
2.13. Auto agregação e Co-agregação.....	52

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1. Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR	52
3.2. Validação do modelo	61
3.3. Estudo cinético do crescimento total de probióticos	62
3.4. Produção de ácidos orgânicos	68
3.5. Testes de digestibilidade <i>IN VIVO</i>	69
3.6. Testes de hidrofobicidade	71
3.7. Testes de Autoagregação e co-agregação	72
4. CONCLUSÃO	74
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75

Capitolo I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Pesquisa realizada por *Euromonitor Internacional* no ano 2017 mostrou que no mercado de saúde e bem-estar, os alimentos funcionais tiveram um aumento de aproximadamente 7% (Martins, 2017) e em 2018 o aumento foi de 43% (*Nutraceuticals world*, 2018). A *Food Business New* em 2017 estimou em 10% o crescimento do mercado de alimentos funcionais até 2022. Esse aumento deve-se em parte ao fato de que o consumidor atual procura alimentos que cumpram outras funções do que as de somente satisfazer a fome ou dar prazer, como por exemplo que contribuam significativamente na prevenção de patologias e aportem benefícios à saúde. Dentro dos alimentos saudáveis que satisfazem essas características encontram-se os funcionais.

Os probióticos são alimentos que contém microrganismos vivos que ao serem ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001). Os probióticos devem segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2008) ter uma concentração de entre 10^8 e 10^9 UFC de acordo com a dose diária recomendada para ter efeito benéfico na saúde do hospedeiro.

Nas bebidas lácteas fermentadas, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g (um milhão de unidades formadoras de colônias por grama) no produto final, durante todo o prazo de validade. No caso em que mencione(m) um ou mais cultivo(s) láctico(s) específico(s), estes também devem atender a esses requisitos segundo o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas instrução normativa nº 36, de 31 de outubro de 2000. Não foram encontradas legislações brasileiras que especifiquem contagem de microrganismos específicos ou de bactérias probióticas em bebidas fermentadas não lácteas. As espécies, maiormente utilizadas como agentes probióticos são os lactobacilos e as bifidobactérias, pois cumprem com a maioria dos requisitos de funcionalidade, no entanto, estas bactérias possuem exigências especiais quanto a requerimentos nutricionais, condições de oxigênio, relaciones simbióticas e pH de meio de cultivo (Curbelo et al. 2005). Outro requisito para alimentos serem caracterizados como probióticos é a resistência as condições extremas do sistema digestório e possuir aderência ao epitélio intestinal para evitar a proliferação de bactérias patogênicas (BIANCHI, 2013). O mercado de alimentos probióticos é dominado por produtos fermentados a base de leite, no entanto,

autores de diversos países vem publicando pesquisas utilizando extratos de vegetais variados, convencionais ou não, entre sementes e grãos como substratos fermentativos (Swain et al., 2014; Tamang, 2015; Patra et al., 2017). O interesse por frutas, plantas e sementes nasceu como alternativa para os consumidores que tem restrições alimentares como alergia às proteínas do leite e/ou intolerância à lactose e também como uma forma de diversificação de produtos não lácteos. Além disso, o número de consumidores veganos, aqueles que levam uma forma de vida que procura excluir, na medida do possível e praticável todas as formas de exploração e crueldade dos animais, já seja na comida, na roupa ou qualquer outro âmbito (The Vegan Society, 1988), tem tido um incremento de 14% no Brasil, segundo estatísticas publicadas pelo Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE) no 2018 e por pesquisas realizadas por Panghal et al. (2018). Observa-se por tanto, a necessidade de desenvolver alimentos que atendam esta demanda.

Uma alternativa de substratos não lácteos são as plantas alimentícias não convencionais (PANC), que são alimentos ou fontes nutricionais com alto potencial para o preparo de pratos variados que não são consumidas comumente pela maioria das pessoas, seja por não fazerem parte dos hábitos alimentares, culturais e costumes, ou, por falta de conhecimento. No Brasil, diversos vegetais como ora-pró-nobis, rica em proteínas, jambu, folha de begônia, entre outros, são considerados como PANC. Dentro das PANC, encontra-se o yacon que junto com amendoim, leguminosa convencional, compõem uma mistura que pode ser utilizada como meio de fermentação com potencial na elaboração de produtos probióticos e simbióticos.

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa de origem andina. É composto de 10-14% de matéria seca, sendo em sua maioria carboidratos do grupo frutano e fibras. As oligofrutoses de inulina representam a maior parte dos carboidratos seguido pelos açúcares livres como sacarose, glicose e frutose, sendo considerado como fonte de prebióticos e rico em compostos bioativos (Caetano, 2016; Santana e Cardoso, 2008).

O amendoim comum (*Arachis hypogaea L.*) é uma oleaginosa originária da América do Sul. Essa leguminosa é fonte de nitrogênio com 25% de proteína em base úmida, por isso é considerada um alimento completo rico em aminoácidos essenciais

segundo padrões de referência da FAO (Wilkin et al., 2014) e com potencial para o desenvolvimento de alimentos substitutos do leite. (Lozano, 2016).

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos da concentração de farinha de yacon e de farinha de amendoim na cinética da fermentação com 4 linhagens probióticas e a funcionalidade das bebidas fermentadas simbióticas, visando obter um produto que atenda às legislações vigentes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Alimentos Funcionais

O termo alimentos funcionais foi utilizado em Japão no ano de 1984 para fazer referência a produtos alimentícios fortificados com constituintes especiais que possuem propriedades que conferem benefícios fisiológicos aos consumidores (Arai, 1996). Globalmente, 'Alimentos funcionais' não é um termo legalizado tendo assim diversas definições no mundo. No Brasil a ANVISA (2007) os define como aqueles que possuem propriedades que estão relacionadas ao papel no crescimento, seja fisiológico ou metabólico de um nutriente ou não nutriente, ao desenvolvimento, conservação e outras funções do organismo humano, sempre e quando seu consumo esteja associado a uma alimentação equilibrada e saudável. Os consumidores modernos interessam-se cada vez mais pela sua saúde, e esperam que os alimentos ingeridos sejam saudáveis e capazes de prevenir doenças. Os ingredientes permitidos pela ANVISA e que tem capacidade funcional comprovada são carotenóides (licopeno, luteína e zeaxantina), ácidos graxos (ômega 3), fitoesteróis, polióis (manitol, xilitol e sorbitol), fibras alimentares (beta glucana, dextrina, frutooligossacarídeo – FOS, goma guar, inulina, entre outras) e probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis*, dentre outros) (ANVISA, 2007). A popularidade dos probióticos tem resultado em pesquisas que visam desenvolver alimentos funcionais probióticos fora do setor lácteo, as novas características dos produtos e dos substratos não convencionais com respeito à tecnologia dos probióticos são o foco dos mercados de alimentos funcionais, o qual procura soluções para os problemas de estabilidade e viabilidade dos probióticos em novos substratos e/ou meios como frutas, sementes, vegetais, entre outros (Farnworth et al., 2007)

2.2. Probióticos

A palavra probióticos provem da etimologia grega e significa a favor da vida, esse vocábulo foi utilizado por primeira vez no ano de 1965 por Lilly y Stillwell referindo-se a fatores que incitavam o crescimento de outros microrganismos; no ano de 1979 Parker redefiniu seu conceito como microrganismos e substâncias que ajudam no balanço intestinal, mas não foi até 1989 quando Fuller incluiu o termino utilizado até a atualidade, que são microrganismos que quando ingeridos em quantidades adequadas

conferem benefícios à saúde do consumidor, definição que hoje em dia e desde o ano 2001 é aceita e utilizada globalmente pela FAO. Segundo RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018 (Brasil,2018) a definição de probiótico é: “micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo” e determina que o uso de e probióticos em alimentos requer a comprovação da sua segurança e benefícios à saúde. Eles também são conhecidos como bioterapêuticos, bioprotetores ou bioprolifáticos, e ajudam a melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal, e estimular as funções protetoras do sistema digestivo.

2.2.1. Características

Segundo SZAJEWSKA et al., 2006, os requisitos para que um microrganismo possa ser considerado como probiótico são: ter origem humana, não ser patogênico, viabilidade durante o processamento e armazenamento, estabilidade frente a ácidos gástricos, à bile e pH do estômago e resistência contra enzima digestivas. Além dessas características, deve seguir os postulados de Hutcheson: ser habitante normal do intestino, ter um tempo de reprodução curto, produzir compostos antimicrobianos, poder sobreviver às barreiras do trato digestivo humano, chegar vivos ao intestino e ter capacidade de adesão ao TIAL – Tecido Linfoide Associado ao Intestino. As bactérias mais proeminentes entre os probióticos são os lactobacilos e bífidobactérias, já que constituem parte majoritária da microbiota natural do trato gastrointestinal e são muito importantes na produção de ácidos orgânicos, sendo *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, e a *Bifidobacterium longum* como as espécies mais utilizadas (Curbelo et al. 2005).

As bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem compostos orgânicos decorrentes da fermentação, como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, e o ácido acético, os quais aumentam a acidez intestinal e as bacteriocinas que são proteínas que auxiliam na destruição de microrganismos patogênicos indesejáveis impedindo sua reprodução e o dano ao epitélio intestinal (Morais, 2006).

Em 1900, Moro isolou pela primeira vez estes microrganismos a partir de células de neonatos, alimentados do leite materno. Os lactobacilos apresentam forma bacilar ou cocobacilar, são gram positivos, desprovidos de flagelos e incapazes de produzir

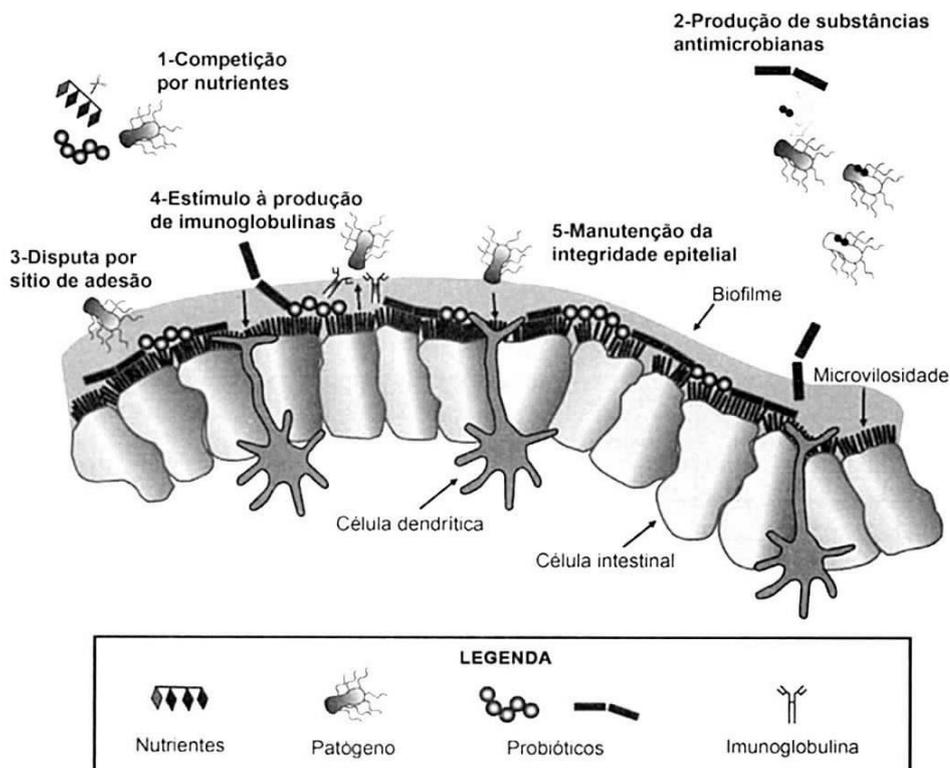
esporos, sendo aerotolerantes ou anaeróbios. Este gênero tem 56 espécies reconhecidas atualmente sendo as mais comerciais *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. (Nogueira e Gonçalves, 2011). Já segundo Watanabe et al., 2003 as bífidobactérias foram isoladas pela primeira vez no século XIX, são gram positivas, não tem flagelos, não produz esporos, são anaeróbicas com catalese negativa e sua morfologia é variada contendo bacilos curtos, curvado e bifurcados; existem 30 espécies de bífidobactérias sendo 10 de origem humana, 17 de origem animal, 2 de águas residuárias e 1 de leite fermentado (a diferença das outras estas espécies é bastante tolerante ao oxigênio). E de grande importância no trato intestinal já que se encontra muito bem distribuída, pelo qual, encontram-se na dieta alimentar independentemente da idade, sendo típico nos neonatos o *B. infantis* e o *B. breve*, na idade adulta são comuns as espécies *B. adolescentis* e o *B. longum*, a qual perdura por toda a vida, tornando-se assim a mais utilizada para compor alimentos funcionais (Curbelo et al. 2005).

2.2.2. Modo de ação dos agentes probióticos

A tolerância dos probióticos à pHs ácidos e enzimas presentes no TGI, produção de componentes antimicrobianos e adesão na mucosa intestinal caracterizam a sua funcionalidade, fazendo com que possam trazer benefícios ao organismo hospedeiro (JERONYMOCENEVIVA et al., 2014; RUBIO et al., 2014). Segundo Doherty (2014) diversos mecanismos para que os probióticos possam trazer esses benefícios a saúde são sugeridos destacando-se a modulação positiva do sistema imune do hospedeiro, importante nos processos de prevenção e tratamento de doenças do trato digestório. Essa modulação é resultado da interação entre moléculas da membrana do microrganismo e as células epiteliais, alterando as vias de sinalização do sistema imunológico.

Os probióticos podem estimular a resposta da imunidade inata contra patogênicos. As células dendríticas intestinais podem reter bactérias convivas, ativando seletivamente os linfócitos B a produzir IgA e diminuir a penetração da mucosa por bactérias indesejáveis. O probiótico estimula a produção de substâncias e componentes citoprotetores nas células humanas bloqueando a indução de apoptose contribuindo na restituição da barreira epitelial danificada (SARKAR E MANDAL, 2016). O mecanismo de isenção competitiva como mostrado na figura 1 se baseia na capacidade

do probiótico de bloquear as ligações entre os receptores das células epiteliais com as adesinas dos microrganismos patógenos, impedindo a aderência dos mesmos. Para conseguir bloquear essas ligações os probióticos produzem componentes antimicrobianos como são ácido lático, peróxido de hidrogênio, ácido acético, e bacteriocinas (JENSEN et al., 2012; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012; SARKAR E MANDAL, 2016). Além da proteção competitiva dos probióticos, a microbiota anaeróbia nativa do TGI limita a concentração de patógenos. (SOCCOL et al., 2010).



McALLISTER, T. A. et al. Review The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, jan. 2011 (adaptado).

Figura 1-1. Mecanismo de ação de agentes probióticos.
Fonte: Mcallister et al, 2011.

2.3. Testes de Funcionalidade

Para um microrganismo ser considerado probiótico este deve se enquadrar ao menos em uma das seguintes categorias: promover a função de barreira epitelial e modular a resposta imune, manter a homeostase da microbiota e inibir a proliferação de

patógeno através das interações bactéria-bactéria isso segundo Lebeer et al. (2008). O microrganismo deve ser de origem humana, ser capaz de aderir bem à mucosa intestinal, apresentar estabilidade frente ao ácido e à bile, ser capaz de produzir compostos antimicrobianos, estar ativo metabolicamente, não ser patogênico (Collins et al., 1998; Lee et al., 1999; Saarela et al., 2000; Stanton et al., 2003). Os agentes probióticos devem obrigatoriamente, aderir benefícios à saúde do hospedeiro, sendo estes evidenciados cientificamente através de estudos com o organismo no qual elas irão atuar (FAO & WHO, 2001; SANDERS, 2003). Existem vários testes para comprovar a funcionalidade probiótica, segundo Mishra e Prasad (2005) os testes de resistências a sais biliares, resistência a acidez produção de compostos antimicrobianos e sobrevivência no trato digestório são importantes para caracterizar uma cepa como probiotica mas o mecanismos antagônicos de competência pelos nutrientes e pelos sítios de adesão ao epitélio e/ou mucosa intestinal é um dos mais importantes, já que a partir da adesão o microrganismos conseguira modular o sistema imune beneficiando a saúde do hospedeiro e poderá produzir biomoléculas que evitaram a propagação de patogênicos. A adesão pode ser medida mediante testes in vitro utilizando células caco-2, mediante ensaios de hidrofobicidade ou por testes de Autoagregação e co-agregação bactéria-bactéria (Busscher et al., 1997).

2.4. Adesão Microbiana

Bactérias residentes e em circulação coexistem no trato gastrointestinal humano (TGI) fazendo-lhe um ecossistema complexo. Essa complexo microbiológico realiza funções fisiológicas e metabólicas, incluindo a manutenção do TGI. O sistema imune está relacionado com o TGI, sendo que, o desequilíbrio desse sistema pode causar diversas desordens gastrintestinais, como o síndrome do intestino irritado, doença de Crohn, entre outros (FOLIGNÉ et al., 2016). As BALs são a microbiota dominante do intestino delgado, as BALs consideradas probióticas tem sido aplicadas como uma alternativa na prevenção dessas doenças devido a que as células imunes estão diretamente associadas com a mucosa intestinal. (SOCCOL et al., 2010; BARBERI et al., 2015; VARANKOVICH et al., 2015). O potencial de adesão das BALs ao epitélio intestinal tem um papel fundamental nessa interação e regulação do sistema imune, já que, pesquisas indicam que mecanismos celulares resultantes da interação desses

microrganismos com as células epiteliais intestinais regulam a resposta imunológica. Desta forma, citocinas pró e anti-inflamatórias são produzidas, contribuindo na manutenção à saúde (VANDERPOOL et al., 2008; VARANKOVICH et al., 2015). *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* contribuem para a ação inibidora da colonização de bactérias patogênicas devido à interação entre a cepa e a superfície da mucosa intestinal promovendo a exclusão competitiva de bactérias patogênicas (RIEDEL et al., 2006; VARANKOVICH et al., 2015). A adesão das bactérias na mucosa intestinal é dependente das estruturas adesivas presentes nas estruturas dos microrganismos (adesinas), além de receptores complementares presentes nas células hospedeiras como observado na figura 1. É influenciada pelas cargas e pela hidrofobicidade, as cargas líquidas das adesinas e dos receptores são negativas o que cria uma força repulsiva, a qual pode ser superada pelas forças atrativas entre as moléculas hidrofóbicas que se encontram presentes em números variáveis em ambas superfícies (Beachey, 1981), tal como mostrado na figura 2. A autoagregação e a coagregação dos probióticos também é um mecanismo importante que envolve um ou mais microrganismos, realizando um processo necessário para ocorrer a adesão ao epitélio intestinal. Uma vez que pode formar barreiras que previnem a colonização por microrganismos patogênicos (Reid et al, 1988; Boris et al, 1997; Del Re et al, 2000).

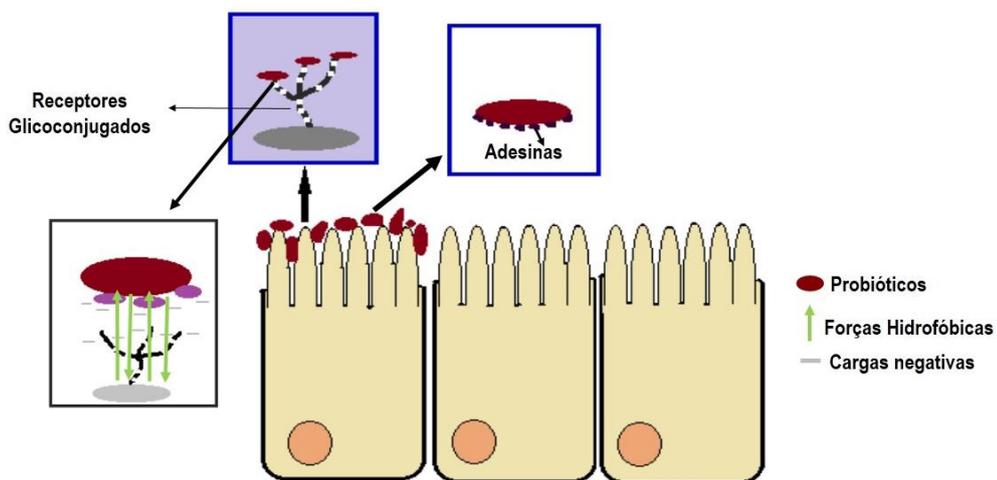


Figura 1-2. Ação das forças atrativas de hidrofobicidade na aderência dos agentes probióticos ao epitélio intestinal.

Fonte: Adaptação de Vilela, 2012.

2.5. Yacon

O Yacon (*Smallanthussonchifolius*), é uma raiz tuberosa originária da região andina da Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Argentina e Bolívia, que data da época pré-Inca (Santana e Cardoso, 2008). Ele foi introduzido no Brasil em 1989 na área de São Paulo por imigrantes japoneses que utilizavam raiz como elemento funcional para combater a diabetes e as altas taxas de colesterol (Vilhena et al, 2000). Esta raiz *in natura* composta principalmente por água, a qual, constitui de 83 a 90% de seu peso fresco fazendo com que seu valor energético seja baixo. Também contém de 10 a 14% de carboidratos armazenados, os quais, na sua grande maioria, estão em forma de frutooligossacarídeos de inulina (FOS) (40-70% em base seca), sendo o alimento com mais contido de FOS nas natureza fazendo com que seja considerado como nutracêutico. Os outros carboidratos encontram-se em forma de açúcares livres, como a sacarose (5-15%), a frutose (5-15%) e a glicose ($\leq 5\%$), além de traços de amido. Seu conteúdo de proteínas é baixo. Comparado com outras raízes, o Yacon é rico em compostos fenólicos ($200\text{mg}/100\text{g}^{-1}$ de matéria fresca comestível) (Santana e Cardoso, 2008). Por ser muito nutritivo, tem sido cultivado nos últimos anos em muitos países como Nova Zelândia, China, Coreia, Paraguai e Taiwan. Atualmente no Brasil seu maior cultivo se concentra no estado de São Paulo, mas, desde o 2013 ele tem sido implementado em Minas Gerais como uma opção de cultivo, e inclusive em cidades como Carandaí, local onde se agrupa sua maior cultivar. Tem substituído a plantação de grãos e cereais mais tradicionais como feijão, tomate e a aboborinha, devido a seu fácil manejo e baixo custo de cultivo (Santos et al., 2013).

Atualmente a Farinha de yacon é utilizada em muitas pesquisas para dar um apelo funcional ao produto devido à alta proporção de oligofrutos presentes nela. Na tabela 1 pode ser observada a composição química da mesma.

Tabela 1-1. Composição química da farinha de yacon (g/100g).

Componente (%)	Rodrigues		
	Moscatto et al., 2006	Vasconcelos 2010	et al., 2011
Umidade	6,79	6,59	6,9
Cinzas	3,75	3,39	5,4
Proteínas	6,41	2,61	2,7
Lípidios	0,58	0,27	0,15
Fibra Totais	sd	11,79	10,53
Carboidratos não diferíveis	sd	sd	38,95
Carboidratos Totais	82,26	87,13	Sd
Glicose	sd	sd	8,6
Frutose	sd	sd	21,1
Sacarose	sd	sd	16,3
Oligofrutanos	17,58	29,27	25,7

Sd: sem dados.

Fonte: Ribeiro 2008; Rodrigues et al., 2011.

2.6. Amendoim

O amendoim comum (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa originária da América do Sul, sendo uma das principais oleaginosas cultivadas no mundo. Em termos de importância econômica, esta oleaginosa é a quarta mais cultivada, ficando atrás apenas da soja, do algodão e da colza. O amendoim, a quarta oleaginosa mais produzida no mundo, é cultivado em mais de 30 países, com especial destaque para o continente africano. Porém, a China a Índia os Estados Unidos são os principais produtores mundiais com 1.6550.213, 6.557.000 e 2.353.540 toneladas respectivamente (FAOSTAT, 2017). Em sul América com 1.165.924 e 402.626 toneladas Argentina e Brasil são destaque sendo que a produção brasileira de amendoim concentra-se na região Centro-Sul e se desenvolve principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (FAOSTAT, 2017). O maior centro de cultivo do amendoim em Brasil se encontra no Estado de São Paulo com 93% da produção nacional (CONAB, 2017).

Essa leguminosa é fonte de nitrogênio porque contém aproximadamente 25-32% de proteína em base úmida, por isso é considerada um alimento completo rico em aminoácidos essenciais segundo padrões de referência da FAO (Wilkin et al., 2014) e

com potencial para o desenvolvimento de alimentos substitutos do leite. O amendoim tem baixo teor de oligossacarídeos e um sabor suave que permitem melhor a aceitação sensorial dos produtos elaborados com ele como ingrediente ou seus derivados em comparação a outras fontes vegetais (Lozano, 2016). Possui teores de carboidratos, fibras alimentares, cinzas e umidade de 20, 8, 3 e 6% respectivamente e é muito valorizado por seu conteúdo de lipídios (36-56% em base seca), sendo sua grande maioria constituídos por triacilgliceróis (95%) e ácidos graxos insaturados (80%) (Norris, 2013; Gonçalves, 2016). Dentre os micronutrientes presentes em maiores quantidades destacam-se potássio, fósforo e zinco (FREIRE et al., 2005) além de tocoferol, vitamina B1 e ácido fólico (MACEDO, 2004).

Segundo Lozano (2016) a farinha de amendoim tem sido usada no desenvolvimento de produtos graças a seu sabor suave, o qual permite melhor a aceitação sensorial dos produtos elaborados com ele como ingrediente ou seus derivados em comparação a outras fontes vegetais.

O aporte de Proteínas do amendoim o classifica como autossuficiente no fornecimento de aminoácidos essenciais quando comparado ao valor de referência da FAO, fornecendo cisteína, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina e hestidina (Lozano, 2011).

2.7. Fermentação Láctica

A fermentação láctica como seu nome o indica produz ácido láctico como composto principal, sendo assim um processo bioquímico produzido por bactérias acidolácticas (Oliveira, 2009). Os microrganismos para sobreviver precisam de energia, para o qual, as bactérias fermentadoras utilizam a lactose e por meio de enzimas conhecidas como lactases degradam a lactose em glicose e galactose, ocorrendo a fermentação a partir da glicose e originando o ácido láctico como produto final tal como observado na Fig. 4.

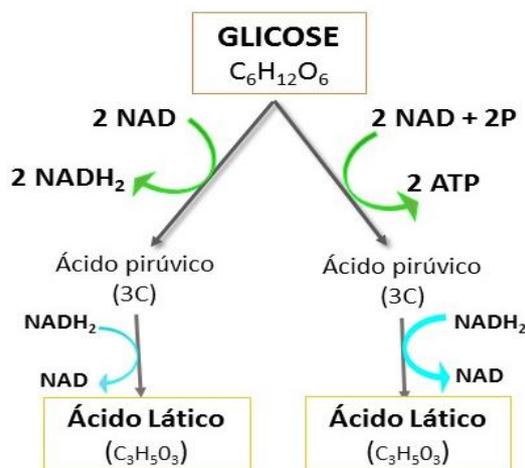


Figura 1-3. Esquema da conversão de glicose em ácido láctico.

Fonte: adaptação de James, 2018

As bactérias do ácido láctico possuem duas formas de metabolizar os carboidratos sendo conhecidos esses metabolismos como homolático ou heterolático. A fermentação homolática ou glicólise fornece exclusivamente lactato como produto final. Já a fermentação heterolática segue a rota do fosfogluconato, fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e CO_2 em quantidades equimolares (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002). Grande parte das bactérias do ácido láctico homofermentativas consegue converter somente glicose em ácido láctico. Em contraste, algumas BAL heterofermentativas são capazes de fermentar tanto hexoses quanto pentoses (GIVRY; PREVOT; DUCHIRON, 2008; ZHU; LEE; ELANDER, 2007).

Na transformação de açúcares a lactato, os açúcares são oxidados pela via glicolítica ou via de Embden Meyerhof-Parnas (EMP), na qual são reduzidos e transformados em piruvato. O piruvato é então reduzido à lactato por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Brock, 2014). A Figura 5 representa o processo metabólico da fermentação de açúcares nas bactérias do ácido láctico

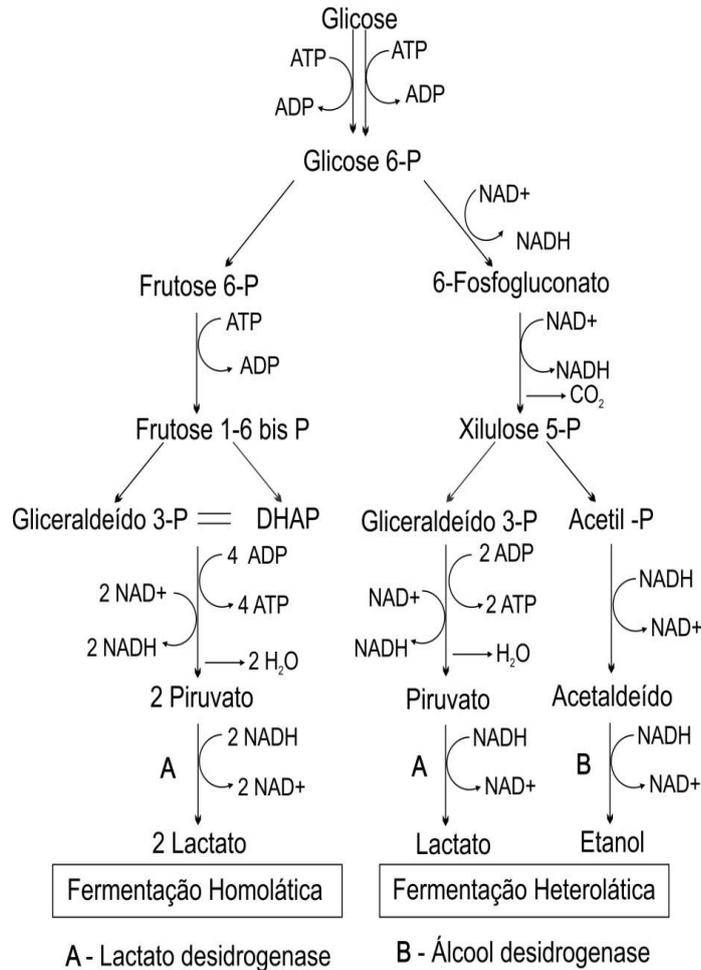


Figura 1-4. Esquema do processo metabólico da fermentação de açúcares nas bactérias do ácido láctico.

Fonte: Adaptado Wee; Kim; Ryu, (2006).

Na indústria de alimentos, as bactérias do ácido láctico (BAL) tem um papel importante nos processos de fermentação ao produzirem alguns ácidos orgânicos, incluindo ácido láctico e ácido acético, já que estes atuam como conservantes naturais, acidulantes e intensificadores de sabor (LI et al., 2014).

O ácido láctico, ou lactato, é o produto principal da fermentação láctica durante o metabolismo de oxidação dos carboidratos para obtenção de energia (LIU, 2002).

2.8. Fermentação De Extratos Vegetais Com Probióticos

Devido ao aumento de pessoas que tem restrito o consumo de produtos lácteos já que tem desenvolvido alergias e intolerâncias à lactose e aos consumidores “veganos” aqueles que levam uma forma de vida que procura excluir, na medida do possível e

praticável todas as formas de exploração e crueldade dos animais, já seja na comida, na roupa ou qualquer outro âmbito (The Vegan Society, 1988), está tendo-se a obrigação de procurar substratos vegetais que possam substituir ao leite, suprimindo as necessidades metabólicas durante o processo de fermentação dos microrganismos probióticos.

A soja tem sido por muitos anos uns dos extratos vegetais maiormente utilizados tendo pesquisas realizadas por Mondragón-Bernal (2004, 2009) na qual desenvolveu uma bebida simbiótica a base de extrato hidrossolúvel de soya utilizando agentes probióticos, Teixeira (2017) realizou uma ampliação de escala fermentando extrato hidrossolúvel de soja fermentado com misturas probióticos, também Riquette no 2013, fermentou uma bebida a base de extrato de soja adicionada de mel de avelha. Mas o interesse por diversificar os substratos vegetais tem aumentado sendo realizados estudo de bebidas fermentadas com aveia, yacon, arroz, brócolis, goiaba, laranja (Coelho, 2009; Bau et al., 2012; Bertagnolli, 2014; Veeck et al., 2018).

2.9. Planejamento experimental

O planejamento experimental apresenta grande importância, já que, o desenvolvimento de um produto abarca inúmeras variáveis, cujo principal objetivo é a minimização de custos e tempo, maximização de rendimento, produtividade e qualidade desses produtos. (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Esta é uma técnica de engenharia utilizada para definir os efeitos que determinadas variáveis tem sobre uma resposta de interesse. No cenário industrial, o planejamento experimental é uma das técnicas que atualmente vem sendo usada em grande escala, uma vez que, mediante seu uso, são obtidos resultados mais confiáveis, com menores custos. Para o uso desta ferramenta é fundamental a integração de três condições: conhecimento do processo, conhecimento estatístico e o bom senso (BOX et al., 2005).

Através deste método, pode-se determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultado: redução da variação do processo, melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos, redução do tempo do processo, redução do custo operacional e melhoria do rendimento do processo (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

O delineamento experimental aceita determinar e quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, fornecendo informações sobre a robustez ou não das respostas desejadas, e também permite a otimização do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A utilização do planejamento experimental reduz o número de ensaio brindando qualidade da informação obtida nos resultados. Além otimiza o processo, possibilita otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo, analisa os fatores simultaneamente e aceita constatar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse, e permite calcular e avaliar o erro experimental (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A escolha do planejamento adequado é uma função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo, da disponibilidade de matéria-prima, da viabilidade do número de ensaios que podem ser realizados e do custo do processo em estudo (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

De acordo com Rodrigues e Iemma (2014) se deve seguir um ordem sequencial para a aplicação do delineamento. Na primeira etapa, é sugerida a seleção de variáveis, por meio de fatorial fracionado ou de Plackett Burman (PB), sendo aplicado quando se tem muitos fatores e pouco conhecimento do processo. Na seguinte etapa é realizada a otimização por meio de um fatorial completo ou Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). E na última etapa, é realizada a validação das condições otimizadas, quando se deseja confirmar experimentalmente os resultados obtidos pela análise de superfície de resposta, neste caso as condições já estão otimizadas e definidas.

2.9.1. Delineamento Composto Central Rotacional

Para uma investigação inicial dos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas desejadas, no caso em que se tem 2 variáveis independentes, recomenda-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

O modelo de regressão alcançado proporciona a análise para o efeito de cada fator individual e para todas as possíveis interações que existem entre as variáveis dependentes e independentes (PRIYADHARSHINI; BAKTHAVATSALAM, 2016). O

DCCR utilizado juntamente com a metodologia de análise de superfície de resposta é mais vantajoso, já que, se obtém uma boa exatidão do experimento realizado (AHMADI et al., 2006).

3. REFERENCIAS

- AHMADI, M. et al. Empirical modeling of olive oil mill wastewater treatment using loofa-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1148-1154, 2006.
- ARAI, S. Estudios sobre alimentos funcionales en Japón: estado del arte. **Biociencia, biotecnología y bioquímica**, v.60, p.9–15, 1996.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2007. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em: [http:// www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecono.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecono.htm). Acesso em: 09 janeiro de 2019.
- AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Third Edition, 2004.
- BARBERI, C.; CAMPANA, S.; DE PASQUALE, C.; KHORASGANI, M. R.; FERLAZZO, G.; BONACCORSI, I. T cell polarizing properties of probiotic. **Bacteria. Immunology letters**, v.168, n.2, p.337-342, 2015.
- BORIS, S.; SUA´REZ, J.E; BARBE´S, C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **J. Appl. Microbiol.**, v.83, p. 413–420, 1997.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery. 2a. ed. Wiley-Interscience New York, 2005.
- BUSSCHER, W.J.; BAUER, P.J.; CAMP, C.R.; SOJKA, R.E. Correction of cone index for soil water content differences in a coastal plain soil. **Soil and Tillage Research**, v.43, n.2, p.205-217, 1997.
- CAETANO, F. R. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. **Nutrients. Basel**, v.8, n.7, p.13. 2016.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p. 487-490, 1998.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Produtos e Serviços: safras, séries históricas. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=> >. Acesso em: 07 Abril de 2019.
- CURBELO, Y.G., GARCÍA, Y., LÓPEZ, A. Y BOUCOURT, R. Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. **Rev Cuba Cienc Agrícola**, v.39, n.2, p.19-140, 2005.
- DEL RE, B.; Busetto, A.; Vignola, G.; Sgorbati, B.; Palenzona, D. Autoaggregation and adhesion ability in a Bifidobacterium suis strain. **Lett. Appl. Microbiol.**, 27, p.307-310, 1998.
- DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**. v.64, p.567–576, 2014
- FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. 2001.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Production. Disponível em < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 05 Abril. 2019.
- FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.116, p.174-181, 2007.
- FREIRE, R.M.M. et al. Aspectos nutricionais de amendoim e derivados. In SANTOS, R.C. (Ed.). O Agronegócio do amendoim no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 389-420, 2005.
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. **Journal or applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378,1989. Apud: International dairy journal. v. 11, p. 1-17, 2001.

- FOLIGNÉ, B.; PARAYRE, S.; CHEDDANI, R.; FAMELART, M. H.; MADEC, M. N.; PLÉ, C.; DEUTSCH, S. M. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. **Food microbiology**, v.53, p.60-69, 2016.
- HUTCHESON, D. Researcher lists characteristics of probiotics. **Feedstuffs**, December p. 14, 1987.
- JAMES, M.J. Microbiologia de Alimentos. Artmed editora s.a., 6 edição, 2018.
- JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; DE PAULA, A. T.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M ; PENNA, A. L. B. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffalo Mozzarella Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. v.6, p.141–156, 2014.
- JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.153, p. 216–222, 2012.
- LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, v. 72, n.4, p. 728, 2008.
- LEE, Y. K.; et al. Handbook of probiotics. New York: Wiley, p. 211,1999.
- LI, C.; LI, W.; CHEN, X.; FENG, M.; RUI, X.; JIANG, M.; DONG, M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 477-485, 2014.
- LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 115-131, 2002.
- LILLEY, D.M. & STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965 Apud **International Dairy journal**, v.9, p.53-61, 1999.

- Lozano, M.G. 2016. Amendoim (*Arachis hypogaea L.*): composição centesimal, ácidos graxos, fatores antinutricionais e minerais em cultivares produzidas no estado de São Paulo. **Dissertação mestrал em ciência e tecnologia de alimentos**, Universidade de São Paulo, escola superior de agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba Brazil.
- MARTINS, R. Tendências e oportunidades em alimentos e bebidas em frente a um consumidor cada vez mais exigente. **Evento Food ingredients South America**, celebrado na Transamérica Expo Center, São Paulo. 22-24 de agosto do 2017.
- McLLISTER, T.A.; BEAUCHEMIN, A.Y.; BAAH, R.M.; STANFORD, K. Review: the used of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. **The Canadian veterinary journal**, v.91, p. 193-211, 2011.
- MISHRA, V.; PRASAD, D.N. **Int J Food Microbiol**, v.103, p.109-115, 2005.
- MONDRAGÓN B., O. L. 2004. Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos. Campinas. **These of Master Degree in Food Engineering**. Food Engineering Faculty. University of Campinas.
- MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZBLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; FERRERO, M. A. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of diferente lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of functional foods**. v. 4, p. 531-541, 2012.
- MORAIS MB DE, JACOB CMA. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **J Pediatr**. v.82, n.5, p. S189-S197, 2006.
- NOGUIRA, J.C. E GONÇALVES, M. Probióticos- revisão da literatura. **Revista Brasileira de ciências da saúde**. v.15, n.4, p.487-492, 2011.
- RIBEIRO, J.A.R. Estudo químico e bioquímico do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) *in natura* e processados e influência do consumo de yacon sobre níveis glicêmicos e lipídeos fecais de ratos. **Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências dos Alimentos**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

- PANGHAL, A., JANGHUB, S., VIRKARA, K., GATA, Y., KUMARA, V., CHHIKARAA, N. Potential non-dairy probiotic products-A healthy approach. **Food Bioscience**, v.21, p.80- 89, 2008.
- PATRA, J.K., DAS, G., PARAMITHIOTIS, S. AND SHIN, H.S. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: **a review. Frontiers in Microbiology**, v.7, p.493, 2016.
- PRIYADHARSHINI, S. D.; BAKTHAVATSALAM, A. K. Optimization of phenol degradation by microalga *Chlorella pyrenoidosa* using Plackett- Burman design and response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 150-156, 2016.
- REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R.; COOK, R.L. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. **Canadian, J. Microbiol.**, v.34, p.344–351, 1988.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Editora Cárita, 3ª Ed., 2014.
- RODRIGUES, F.C.; CASTRO, A.S.B.; DUARTE, M.; FERREIRA, C.L. Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): produção e caracterização química. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.70, n.3. p.290-296, 2011.
- RUBIO, R. JOFRÉ, A. MARTÍN, B. AYMERICH, T. GARRIGA, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 38, p. 303 – 311, 2014.
- SAARELA, M; et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, p. 91-99, 2003.

- 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.
- SARKAR, A.; MANDAL, S. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. **Microbiological Research**, v.192, p.159-171, 2016.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M.R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C.T.; LINDNER, J. D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The Potential of Probiotics: A Review. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, p.413– 434, 2010.
- STANTON, C.; et al. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E. R. (Ed.) Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Press, p. 27-58, 2003.
- SZAJEWSKA H, SETTY M, MRUKOWICZ J, GUANDALINI S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. **J Pediatric Gastroenterol Nutr.**, v.42, n.5, p.454-75, 2006.
- TAMANG, J.P. Naturally fermented ethnic soybean foods of India. **Journal of Ethnic Foods**, v.2, n.1, p.8-17, 2015.
- TEIXEIRA, M.A. Estudos Cinéticos Da Produção De Fermentado Simbiótico De Soja. **Dissertação para obtenção do título de mestrado em Ciência dos Alimentos**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2017.
- SWAIN, M.R., ANANDHARAJ, M., RAY, R.C. AND PARVEEN, R. Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. **Biotechnology Research International**, p.19, 2014.
- VANDERPOOL, C.; YAN, F.; POLK, D. B. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory bowel diseases**, v.14, n.1, p.1585-1596, 2008.

- VARANKOVICH, N. V.; NICKERSON, M. T.; KORBER, D. R. Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. **Frontiers in microbiology**, 6, 2015.
- VILELA, R. M. Aspectos bioquímicos da interação dos probióticos com a mucosa intestinal. Disponível em: < <https://www.slideserve.com/sawyer/aspectos-bioquimicos-da-intera-o-dos-probi-ticos-com-a-mucosa-intestinal>>. Acessado em 10/02/2019.
- VILHENA, S.M.C.; CÂMARA, F.L.; KADIHARA, S.T. O cultivo do yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, n.1, p.5-8, 2000.
- WATANABE S, NARISAWA Y, ARASE S, OKAMATSU H, IKENAGA T, TAJIRI Y, KUMEMURA M. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. **J Allergy Clin Immunol**, v.11, n.3, p.587-91, 2003.
- WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163–172, 2006
- WILKIN, J.D; ASTON, I.P.; FIELDING, L.M.; TATHAM, A.S. Storage stability of whole and nibbed, conventional and high oleic peanuts (*Arachis hypogea L.*). **Food and Bioprocess Technology**, v.7, n.1, p.105-113, 2014.

Capitulo II- ARTIGO

Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*) por quatro linhagens probióticas.

Hernández-Torres, Dina Luz^a, Mondragón-Bernal, Olga Lucía^a, Ngome T. Moises^b, Batista, Luiz Roberto^a.Alves L. F., Jose Guilherme^{a*}

^aFederal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras/MG, Brazil, B.O.: 3037, Zip: 37.200.000.

^bDepartment of Agricultural Production, Eduardo Mondlane University (UEM-ESUDER), Julius Nyerere Road, Post Office Box n^o 254, Mozambique

*Corresponding author.

E-mail: jlembi@dca.ufla.br

RESUMO

O número crescente de consumidores de veganos mostra a demanda por alimentos nesse segmento. Uma das alternativas de produtos é a elaboração de fermentados probióticos de extratos vegetais alternativos. Cinéticas da fermentação de meios contendo farinha de yacon (FY) e farinha de amendoim (FA) por cultura mista de *Lactobacillus rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus* (LA14), *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (LBC81) e *Bifidobactéria longum* (BL04) foram estudadas. Foram avaliados os efeitos das concentrações de FY (% m/v) e FA (% m/v) no crescimento celular, acidez, pH, consumo de açúcares redutores (AR) e consumo de açúcares redutores totais (ART) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 13 tratamentos. Foi avaliada a funcionalidade probiótica da bebida fermentada por meio de viabilidade e contagem final, testes digestivos simulados, hidrofobicidade, autoagregação e co-agregação celular *in vitro*. Verificou-se que na região entre 6-8% de FY e de FA foram obtidas as maiores contagens totais probióticas e de bifidobactérias. Os modelos para contagem total (CT), contagem de bífidobactérias (CB), AR e ART foram validados pela ANOVA ($p < 0.005$). A viabilidade probiótica final nos testes digestivos simulados se manteve acima de 6 log UFC/mL, exigido pela legislação brasileira nos ensaios contendo substratos vegetais. O valor de hidrofobicidade para a bebida (60,8%) foi maior que o das cepas puras e o inoculo, a BL04 apresentou o maior porcentagem de autoagregação (61,3%) e o inoculo o maior porcentagem de co-agregação (61,23%), características positivas da funcionalidade probiótica quanto a aderência ao Tecido Linfoide Associado ao Intestino (GALT).

Palavras chaves: Extratos vegetais alternativos, adesão microbiana, alimento funcional simbiótico, funcionalidade priobiótica, delineamento composto rotacional (DCCR), *Lactobacillus spp. rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus* (LA14), *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (LBC81) e *Bifidobacterium longum* (BL04).

ABSTRAC

The growing number of vegan consumers shows the demand for food in this segment. One of the product alternatives is the elaboration of probiotic ferments from alternative plant extracts. Kinetics of media fermentation containing yacon (FY) flour and peanut flour (FA) by mixed culture of *Lactobacillus rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus* (LA14), *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (LBC81) and *Bifidobacterium longum* (BL04) were studied. The effects of FY (% m / v) and FA (% m / v) on cell growth, acidity, pH, reducing sugars consumption and total reducing sugar consumption (ART) were evaluated using a central composite rotational design (CCRD) of 13 treatments. The probiotic functionality of the fermented beverage was evaluated through viability and final count, simulated digestive tests, hydrophobicity, autoaggregation and in vitro cellular co-aggregation. It was verified that in the region between 6-8% FY and FA the highest total probiotic and bifidobacteria counts were obtained. The models for total counting (CT), counting of bifidobacteria (CB), RA and ART were validated by ANOVA ($p < 0.005$). The final probiotic viability in the simulated digestive tests remained above 6 logUFC / mL, required by Brazilian legislation in the tests containing plant substrates. The hydrophobicity value (60.8%) was higher than that of the pure and mixed inoculum (without addition of substrates), the BL04 presented the highest percentage of autoaggregation (61.3%) and the inoculum had the highest percentage of co-aggregation (61.23%), positive characteristics of the probiotic functionality regarding adherence to the Intestine Associated Lymphoid Tissue (GALT).

Keywords: Alternative plant extracts, microbial adhesion, symbiotic functional food, probiotic functionality, central composite rotational design (CCRD), *Lactobacillus* spp. *rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus* (LA14), *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* (LBC81) and *Bifidobacterium longum* (BL04).

1. INTRODUÇÃO

Uma pesquisa realizada por *Euromonitor Internacional* no ano 2017 mostrou que no mercado de saúde e bem-estar, os alimentos funcionais tiveram um aumento de aproximadamente 7% (Martins, 2017), no ano 2018 esse mercado teve um aumento de 43% quando comparado com o 2017 (*Nutraceuticals world*, 2018). A empresa de consultoria *New Nutrition Business* (2018) identificou o mercado de alimentos saudáveis para o intestino como a tendência número um do 2019 e a *Food Business New* em 2017 publicou um artigo no qual a agência de nutrição *Kerry Beloit Wi* adquiriu a companhia de probióticos *Ganeden* prevendo um crescimento de 10% no mercado deste até o 2022. Esse aumento deve-se à procura dos consumidores por produtos com apelos funcionais que aportem benefícios ao organismo, já que, o consumidor atual entende que o alimento deve cumprir funções muito além de só satisfazer a fome, trazer prazer ou sobrevivência ele deve contribuir significativamente na prevenção de patologias e aportar benefícios à saúde além das funções nutricionais básicas. Evitar o aparecimento de doenças tornou-se prioritário em relação à cura em parte devido aos altos custos médicos, mas também por maior consciência da relação existente entre saúde, alimento e doença. Dentro dos alimentos funcionais encontram-se produtos simbióticos, ou seja, aqueles contendo probióticos e prebióticos simultaneamente.

Segundo RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018 (Brasil,2018) a definição de probiótico é: “micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo” e determina que o uso de probióticos em alimentos requer a comprovação da sua segurança e benefícios à saúde. A RDC ANVISA Nº 2, DE 7 DE JANEIRO DE 2002, explica que probiótico é o nome do microrganismo, acompanhado da forma de apresentação do produto que deve constar a quantidade dos microrganismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto. Esta informação deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e ou de saúde do produto e fora da Tabela de Informação Nutricional (Brasil, 2002). Os probióticos devem Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) ter uma concentração de entre 10^8 e 10^9 UFC de acordo com a dose diária recomendada para ter efeito benéfico na saúde do hospedeiro.

Nas bebidas lácteas fermentadas, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g (um milhão de unidades formadoras de colônias por grama) no produto final, durante todo o prazo de validade. No caso em que mencione(m) um ou mais cultivo(s) láctico(s) específico(s), estes também devem atender a esses requisitos segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, segundo instrução normativa nº 36, de 31 de outubro de 2000. Não foram encontradas legislações brasileiras que especifique Contagem de microrganismos específicos ou de bactérias probióticas em bebidas fermentadas não lácteas.

As espécies maiormente utilizadas são os lactobacilos e as bífidobactérias, que tem requerimentos nutricionais, potencial de oxido-redução, relações simbióticas e condições ótimas de pH e oxigênio para seu crescimento (Curbelo et al. 2005). Os probióticos também devem cumprir uma série de requisitos para ser caracterizados como probióticos dos quais se destaca que devem resistir as condições extremas do sistema digestório e ter capacidade de aderência ao GALT. A adesão das baterias na mucosa intestinal é dependente das estruturas adesivas presentes na parede celular dos microrganismos (adesinas), além de receptores complementares presentes nas células hospedeiras. É influenciada pelas cargas e pela hidrofobicidade, as cargas líquidas das adesinas e dos receptores são negativas, o que cria uma força repulsiva, a qual pode ser superada pelas forças atrativas entre as moléculas hidrofóbicas que se encontram presentes em números variáveis em ambas superfícies (Beachey, 1981). A autoagregação (capacidade de ligação dos microrganismos entre eles) e a co-agregação (capacidade de ligação dos microrganismo com outras espécies) dos probióticos também é um mecanismo importante que envolve um ou mais microrganismos, realizando um processo necessário para ocorrer a adesão ao epitélio intestinal. Uma vez que pode formar barreiras que previnem a colonização por microrganismos patogênicos (Reid et al, 1988; Boris et al, 1997; Del Re et al, 2000).

O mercado de alimentos probióticos concentra-se em produtos fermentados com substratos de origem lácteo, mas nos últimos anos, observa-se na literatura várias pesquisas utilizando sementes e vegetais como substrato fermentativo (Martin et al., 2013; Swain et al., 2014; Sahlin, 1999; Blandino et al., 2003; Marshall e Mejia, 2011; Tamang, 2015; Patra et al., 2016). O interesse por frutas, plantas e sementes não nasceu só como uma forma de diversificação de produtos não lácteos, mas também para suprir

a demanda dos consumidores limitados por alergias e intolerâncias a lactose. Além disso o número de consumidores veganos aqueles que levam uma forma de vida que procura excluir, na medida do possível e praticável todas as formas de exploração e crueldade dos animais, já seja na comida, na roupa ou qualquer outro âmbito (The Vegan Society, 1988), tem tido um incremento de 14% no Brasil, segundo estatísticas publicadas pelo Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE) no 2018 e por pesquisas realizadas por Panghal et al.(2018). fazendo necessário desenvolver alimentos que compensem esta demanda. Uma alternativa de substratos no lacteos são as plantas alimentícias não convencionais (PANC). Dentro das PANC, encontra-se o yacon que junto como amendoim, leguminosa convencional, compõem uma mistura que pode ser utilizada como meio de fermentação com potencial na elaboração de produtos probióticos e simbióticos.

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa de origem andina, que é rica em frutooligossacarídeos de inulina e açúcares livres como sacarose, glicose e frutose, considerado como excelente prebiótico e rico em compostos bioativos (Caetano et al., 2016).

O amendoim comum (*Arachis hypogaea L.*) é uma oleaginosa originária da América do Sul e é considerado um alimento completo e fonte proteica contendo aproximadamente 25% em base úmida. Fornece aminoácidos essenciais quando comparado a outros padrões de referência da FAO (Wilkin et al., 2014). Além disto tem baixo porcentagem de oligossacarídeos e um sabor suave, fazendo com que os produtos feitos à base de farinha de amendoim sejam bem aceitos em comparação a outras fontes vegetais (Lozano, 2016).

Por tanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos parâmetros: concentração de farinha de yacon e de farinha de amendoim para formular uma bebida fermentada à base yacon e amendoim, visando obter um produto que atenda as legislações vigentes e caracteriza-la funcionalmente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a formulação do meio fermentativo foram usadas farinha integral de yacon da empresa Emporio Grão de Ouro (São Paulo, Brasil) e farinha integral de amendoim adquirida no comercio local (A Granel, Lavras, Brasil). As linhagens probióticas,

utilizadas como inóculo para as fermentações, foram adquiridas em envelopes liofilizados e mantidas em estoque a -20 °C, sendo: *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81(LBC), *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 (LR), *Bifidobacterium longum* BL04 (BL) (Danisco Dupont® - São Paulo, Brasil) e o *Lactobacillus acidophilus* LA-14 (LA) (Aché® - (Guarulhos, Brasil)

2.1. Ativação e propagação dos microrganismos liofilizados

A ativação foi realizada seguindo a metodologia de Teixeira (2017). 1g do microrganismo liofilizado foi transferido para caldo MRS, previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min. Em seguida, foram mantidos em estufa B.O.D a 37°C por 48 h. foi usada a formulação de MRS (Man, Rogosa e Shape) de De Man et al., (1960) (Formulação 1L: *peptona bacteriológica* 10g, *extrato de carne* 10g, *extrato de levedura* 4g, *D-glicose* 20g, *Tween-80* 1g, *fosfato dipotássio* 2g, *acetato de sódio* 5g, *Citrato de tri-amonio* 2g, *MgSO₄.7H₂O* 0,2g, *MnSO₄.4H₂O* 0,05g)

O pre-inóculo ativado foi transferido para caldo MRS estéril e mantido em estufa B.O.D a 37 °C por 24h. Com o objetivo de obter colônias novas e puras, foi feita isolamento por esgotamento, para o qual uma alçada de cada cultura ativada foi estriada, em triplicata, em placas contendo Agar MRS, e foram incubadas em B.O.D a 37°C por 72 horas, lactobacilos em aerobiose e bifidobactérias em anaerobiose por meio de jarras herméticas e geradores Anerobac Porobac (São Paulo, Brasil). Uma colônia isolada de cada cepa foi transferida para tubo previamente esterilizado (121°C por 15 min) e que continha 10 mL de caldo MRS e foi incubada a 37°C por 24h. Em seguida, foi transferido todo o conteúdo de cada cultura ativada (10 mL) em erlenmeyer contendo 90 mL de caldo MRS estéril e mantido a 37 °C. Após 24 h, os inóculos ativados foram transferidos para ependorfs e centrifugados (Spinlab modelo SL-5AM, São Paulo, Brasil) a 7126g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, meio congelante estéril foi acrescido aos microrganismos concentrados e foram estocados nos ependorfs em condições de congelamento (-20°C) para uso futuro como cultura estoque (metodologia adaptada de Souza et al., 2015 e Teixeira, 2017). Contagens individuais foram realizadas.

2.2. Preparo do inóculo

O inóculo para a fermentação foi ativado a partir da cultura estoque com MRS. Após 24 h foi feita verificação das contagens pelo método padrão detalhado no item 2.7, 10% (v/v) do inóculo (10 mL) foi transferido para erlenmeyer contendo 90 mL do meio de fermentação, com os microrganismos nas seguintes proporções: BL04 (6 mL), LA14 (1,5 mL), LBC81 (1,5mL) e LR32 (1 mL) segundo metodologia adaptada de Mondragón-Bernal (2004 e 2005).

2.3. Planejamento experimental

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 2 variáveis e 5 repetições no ponto central, (RODRIGUES, IEMMA, 2014) para um total de 13 ensaios, as repetições foram feitas já que os processos microbiológicos tem maior erro experimental. As variáveis independentes foram: x_1 - Farinha de yacon (% m/v) (FY: 0-12 g/100mL) e x_2 - Farinha de amendoim (% m/v) (FA: 2,8-11,2 g/100mL). As variáveis resposta foram contagem total de microrganismos (em Log UFC/mL), fator de crescimento total ($\text{Contagem}_{\text{Final}}/\text{Contagem}_{\text{Inicial}}$), contagem de bactérias lácticas (em Log UFC/mL) e seu fator de crescimento ($\text{Contagem}_{\text{FinaldeBALS}}/\text{Contagem}_{\text{InicialdeBALS}}$), contagem de bifidobactérias ((em Log UFC/mL) e seu fator de crescimento ($\text{Contagem}_{\text{Finaldebifidobactérias}}/\text{Contagem}_{\text{Inicialdebifidobactérias}}$), consumo de açúcares redutores (AR) e consumo de açúcares redutores totais (ART), Na Tabela 1 encontram-se os níveis e os valores reais do DCCR aplicados neste estudo.

Tabela 2-1. Delineamento experimental DCCR para fermentado simbiótico elaborado com farinhas de yacon e amendoim.

Variáveis	Código	-1,41	-1	0	1	1,41
(%) Farinha de Yacon	X ₁	0	1,75	6,0	10,25	12
(%) Farinha de Amendoim	X ₂	2,8	4,0	7,0	10	11,2

A matriz do planejamento pode ser observada na tabela 3 dos resultados.

2.4. Fermentação

As fermentações foram realizadas em escala laboratorial em tubos fechados contendo 15 mL dos meios preparados com farinha de yacon e farinha de amendoim,

segundo o DCCR. Os meios foram esterilizados a 121°C / 15min e resfriados a aproximadamente 45°C e inoculados em condições assépticas com o mix de probióticos. As fermentações ocorreram sem agitação a 37°C em B.O.D. e foram interrompidas após 6h. Amostras foram coletadas em triplicata a cada 2 horas para estudos cinéticos de contagem total (CT), contagem diferenciada de Lactobacilos (CL) e contagem diferenciada da bifidobactéria (CB), acidez (g/L) e pH.

2.5. Análise estadística

Para análise estatística do delineamento experimental DCCR, foram utilizados os dados do final das fermentações, sendo que as variáveis dependentes ou respostas foram: Fatores de Crescimento para Contagem Total (FC_{CT}), Contagem de Lactobacilos (FC_{CL}) e Contagem de Bifidobactérias (FC_{CB}), Consumo de Açúcares Redutores (AR= AR inicial – AR final) (g/L), Formação Total de Ácidos (PA) (Acidez=Acidez final-Acidez Inicial em g/L) e Variação de pH (pH= pHinicial-pHfinal).

Os coeficientes de regressão das variáveis independentes foram determinados e a análise de variância ANOVA foi realizada a 95% de confiança (p≤0,005), sendo ajustados modelos de regressão polinomial de segunda ordem (equação 1),

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

onde β_0 - é constante do modelo, β_i - é coeficiente linear, β_{ii} - é coeficiente quadrático, e β_{ij} - é coeficiente de interação; X_i e X_j - são as variáveis independentes; k - é o número de fatores testados (k=2); e ε é o erro experimental. A partir dos modelos ajustados foram geradas superfícies de resposta e curvas de contorno com auxílio do *software Statistica 8.0* (Statsoft, 2008) (RODRIGUES, IEMMA, 2014).

2.6. Validação do modelo

Os modelos ajustados a partir do DCCR para fator de crescimento da contagem total (FC_{CT}), fator de crescimento para contagem de bifidobacterias (FC_{CB}), o consumo de açúcares redutores (ART) e o consumo de açúcares redutores totais (ART) foram validados por meio da condução de dois experimentos em triplicata, elaborados com teores de farinha de yacon e amendoim dentro da região de ótimo.

2.7. Contagem padrão de bactérias probióticas

Para a Contagem Total (CT) de probióticos foram retiradas a cada 2 h amostras de 0,5 mL e transferidas para eppendorffs contendo 4,5 mL de água peptonada (0,01%), a partir dessa primeira diluição foram feitas diluições decimais subseqüentes e plaqueamento em profundidade em Agar MRS + 0,1% de azul de anilina e incubadas em B.O.D. por 72 horas a 37°C em condições de anaerobiose e aerobiose. As condições de anaerobiose foram obtidas por meio de jarras herméticas e geradores Anerobac Probac (São Paulo, Brasil). A CT corresponde à contagem em anaerobiose e expressa em logUFC/mL. A contagem diferenciada para lactobacilos (CL) corresponde à contagem em aerobiose e a contagem de bifidobactéria (CB) foi calculada como a diferença entre a CT e CL de acordo com metodologia desenvolvida por Mondragón-Bernal et al (2005). Todas as contagens foram feitas em triplicata.

2.8. Medição do pH e acidez titulável

O pH foi medido em potenciômetro MS Tecnocon Instrumentação (São Paulo, Brasil).

Para a determinação da acidez titulável foi diluído 1,0 mL da amostra em água destilada e titulado com solução de NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína 1% como indicador. A acidez titulável expressa em porcentagem de ácido láctico e determinada pela equação 2 (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

$$AT \text{ em ácido láctico} = \frac{V \times f \times 90 \times M}{A} \quad (2)$$

Onde, AT: acidez titulável em (g/L); V: volume da solução NaOH gasto na titulação (mL); A: volume da amostra (mL); f: fator de correção da solução de NaOH; 90: fator de conversão do ácido láctico; M: molaridade da solução de NaOH (número de mols/L da solução de NaOH).

2.9. Determinação de açúcares redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)

Para a determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), as amostras foram centrifugadas (3000 g / 30 min). O sobrenadante foi diluído apropriadamente em água destilada e foi feita a determinação de AR e ART pelo método Espectrofotométrico – 3,5-DNS de Miller (1959). Para determinação de ART

foi feita previamente uma hidrólise ácida, adicionado 2mL de HCl 2M na amostra a qual foi agitada e deixada no banho maria por 5min, em seguida foi resfriada em banho de gelo por 5min e adicionada de NaOH 2M. A absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro Bioespectro SP-22 a 540 nm. A curva padrão foi elaborada utilizando-se glicose (Synth, São Paulo, Brasil) (0-1g/L) para AR e sacarose (Synth, São Paulo, Brasil) (0-3g/L) para ART.

2.10. Determinação de ácidos orgânicos

Esta análise teve como objetivo quantificar os ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e propiônico) presentes nos tempos 0h e 8h dos tratamentos da validação da bebida fermentada a base de farinha de yacon e farinha de amendoim. As amostras foram diluídas em uma proporção de 1:20 e filtradas com filtro de 0,22 µm; em seguida foram armazenadas sob refrigeração para posterior análise via HPLC.

2.10.1. Preparo dos padrões

Preparou-se 50mL de solução padrão de ácido láctico, acético e propiônico, com concentração de 10g/L, e um mix (mistura dos três ácidos) com concentração de 0,1g/L de cada. Para a construção da curva analítica, foram preparadas 7 soluções a partir das soluções estoque dos ácidos láctico, acético e propiônico. Na tabela 2 encontram-se os valores dos pontos dos sete pontos da curva e na tabela 3 os volumes para preparo das soluções.

Tabela 2-2. Concentração dos ácidos orgânicos.

Analito	Concentração Curva Analítica						
Ac. Láctico	5	100	250	750	1000	2500	5000
Ac. Acético	5	50	100	250	500	750	1000
Ac. Propiônico	1	50	250	500	750	1000	1500

Tabela 2-3. Volumes para preparo dos mix, a partir de soluções a 10g/L.

Mix	Lático (μL)	Acético (μL)	Propiônico (μL)	Agua (μL)	Total (μL)
1	0,5	0,52	10	989	1000
2	5	10	5	980	1000
3	10	25	25	940	1000
4	25	75	50	850	1000
5	50	100	75	775	1000
6	75	250	100	575	1000
7	100	500	150	250	1000

Obs: Para o preparo do primeiro mix foi necessária uma diluição prévia do ácido propiônico para se obter uma solução 0,1 g/L, sendo assim foi utilizado 10 μL da solução padrão para se obter uma concentração final de 0,001 g/L

2.10.2. Método analítico

A análise foi realizada em um sistema HPLC Shimadzu, constituído por duas bombas LC-20AD, degaseificador DGU-20A³, sistema de controle CBM-20^a, forno de coluna CTO-20^a, detector SPD-M20Ae amostrador automático SIL-20AHT. Os dados foram adquiridos e processados com uso de software LC-Solution. As amostras foram analisadas nas seguintes condições:

Coluna utilizada na análise: Supelcogel C₆₁₀H, 30 cm x 7,8 mm x 9,0 μm , equipada com pré-coluna;

Fase móvel: HClO₄ 100mM em H₂O;

Fluxo: 0,45 mLmin⁻¹;

Tempo de corrida: 30 minutos;

Temperatura da análise: 50°C;

Comprimento de onda de análise: 210nm;

Volume de injeção: 10 μL

2.11. Testes *in vitro* de resistência de probióticos às condições simuladas do trato Digestório humano

Foram elaborados sucos digestivos artificiais conforme as metodologias adaptadas de Bernucci (2017) e Mondragón-Bernal (2009), para avaliar a resistência dos microrganismos presentes no produto fermentado a base de farinha de yacon e farinha de amendoim às condições simuladas do trato digestório humano. Os sucos digestivos foram preparados com solução tampão Bicarbonato de sódio-carbonato de sódio 0,1 M adicionados das enzimas e sais mais característicos de cada solução digestiva cuja composição foi a seguinte:

- Saliva: Foi preparada com lisozima 1g/L (de clara de ovo – Interprise, São Paulo/Brasil) e α -amilase 0,3 g/100mL (Termamyl® - Novosyme, Dinamarca) e tampão bicarbonato de sódio-carbonato de sódio 1.M pH 6,0.

- Suco gástrico: HCl 0,08 M pH 1,2; com pepsina 0,32g/L (affymetrix - Thermo Fisher Scientific, California/ USA), lipase 0,2 g/L (de pâncreas suína - Tipo II, Sigma Aldrich, São Paulo/Brasil) e quimosina 0,002 g/L (Fermentech, São Paulo/Brasil).

-suco intestinal: foi preparado com sais biliares 0,33 g/L (Sigma Aldrich, São Paulo/Brasil), invertase comercial 0,25 g/L (Sigma Aldrich, São Paulo/Brasil) e lisozima 1g/L (de clara de ovo – Interprise, São Paulo/Brasil). Foi usada solução tampão bicarbonato de sódio-carbonato de sódio 1.M pH 8,0.

-Suco pancreático: foram usadas pancreatina 0,83 g/L (de pâncreas suíno, Darmstadt/Germany) tripsina 0,1g/L (Novosyme, Sigma Aldrich, São Paulo/Brasil) e lipase 0,02 g/L (de pâncreas suína - Tipo II, Sigma Aldrich, São Paulo/Brasil). Foi usada solução tampão bicarbonato de sódio-carbonato de sódio 1.M pH 8,0.

Todos os sucos digestivos foram esterilizados a frio através de filtração usando membrana de 0,2 μ m (Chromafil-Induslab/Curitiba, Parana/Brasil) em condições assépticas.

2.11.1. Digestão *In Vitro*.

Foi adicionado 1,0 mL de amostra em 9 mL da saliva simulada. Esta mistura foi agitada em agitador de tubos por 10 segundos e incubada por 5 minutos a 37 °C. foi

retirada amostra para plaqueamento e posteriormente adicionado 10 mL do suco gástrico e incubado por 2 tempos, uma e três horas para simular a digestão estomacal. A terceira hora se realizou uma centrifugação e o sobrenadante foi descartado, foi adicionado 5mL de suco intestinal e 5 mL do suco pancreático e incubado novamente por dos tempos 4 e 8 horas. As amostras foram coletadas em triplicata nos seguintes tempos: cinco minutos, uma, três, quatro e oito horas. Foi realizada contagem em placa em meio MRS, para controle da perda de viabilidade dos microrganismos.

2.12. Teste de hidrofobicidade

A hidrofobicidade foi testada utilizando o solvente xilol ou xileno (Synth, São Paulo, Brasil). O Xileno é um hidrocarboneto aromático constituído por uma mistura de três isômeros: *o*-xileno, *m*-xileno e *p*-xileno. O xileno comercial contém 20% do isômero orto, 40% do meta e 20% do para, 15% de etilbenzeno e o restante de outros hidrocarbonetos aromáticos. A hidrofobicidade foi calculada de acordo a metodologia de Mishra e Prasad (2005) para as linhagens puras, o inóculo e células centrifugas da amostra fermentadas de farinha de yacon e amendoim, elaboradas para validação do DCCR (T1=7%FY e 7%FA). As culturas selecionadas foram cultivadas em caldo MRS a 37°C por 24h e centrifugadas a 1008g/15min, foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) e ressuspensas no mesmo tampão fosfato 0,1M (pH 6,2) para medição da absorbância inicial (A) a 600nm em espectrofotômetro Biospectro SP-22. Em tubos de ensaio foram colocados 5 mL da suspensão celular em tampão fosfato 0,1M pH 6,2, adicionados de 1ml do hidrocarboneto xileno e misturados com auxílio de agitador tipo *vortex* (Vision Scientific KMC-1300V) a alta velocidade durante 2min. Os tubos foram incubados por 1h a 37°C para permitir a separação das fases. Com auxílio de uma pipeta *Pasteur* a fase inferior aquosa foi coletada em cubeta de quartzo e foi realizada leitura da absorbância final (A₀) a 600 nm. Quanto menor a absorbância na fase aquosa maior será a hidrofobicidade da superfície celular (H%), calculada utilizando a equação 3:

$$H\% = \frac{(A-A_0)}{A} \times 100 \quad (3)$$

Onde, A= absorbância inicial, A₀= absorbância final.

2.13. Auto agregação e Co-agregação

Para medir a capacidade de auto-agregação foi utilizada a metodologia de Mishra e Prasad (2005). foram utilizadas as linhagens puras e o inóculo (utem 2.2). As linhagens puras e o inoculo foram cultivadas em caldo MRS em aerobiose e anaerobiose a 37°C por 24. As amostras foram centrifugadas a 1372 g durante 10min em tampão fosfato salino 0,1mol/L pH 7,0. Cada suspensão foi submetida à forte agitação com vortex durante 10 s e incubada por 6h, a cada hora foi retirado 1mL da amostra e realizou-se leitura da absorbância a 600 nm. A porcentagem de auto-agregação foi calculada mediante a equação 4:

$$\text{Autoagregação\%} = 1 - \frac{A_t}{A_0} \quad (4)$$

Onde,

At= absorbância em diferentes pontos do tempo, A₀= absorbância inicial.

No teste de coagregação, a metodologia empregada foi a mesma do teste de autoagregação, porém, os microrganismos foram utilizados em conjunto (1 ml de suspensão celular de cada um). Para calcular a porcentagem de coagregação, foi utilizada a equação de Handley et al (1987).

$$\%Coagregação = \left(\frac{(ALR + ALBC + ABL + ALA) - AMIX}{(ALR + ALBC + ABL + ALA)/4} \right) \quad (5)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR

Na Tabela 5 encontram-se os resultados das respostas para o crescimento dos microrganismos no delineamento experimental DCCR cujas variáveis independentes foram as porcentagens de farinha de yacon e de amendoim usadas como substrato para fermentação por cultura mista de agentes probióticos. Analisando os resultados apresentados na Tabela 4, verificou-se que para contagem total dos microrganismos o fator de crescimento (FC_{CT}) variou entre 1,29 e 1,56, com as contagens totais ao final da fermentação variando entre 1,95.10¹⁰ UFC/mL (tratamento 5) e 3,7. 10¹² UFC/mL (tratamento 6), sendo que no meio de fermentação do tratamento 5, não foi adicionada

farinha de yacon, enquanto que no tratamento 6, foi adicionada a maior quantidade de farinha de yacon (12% m/v). Para fator de crescimento e contagem final das bifidobactérias, os maiores valores foram 1,59 e $2,95 \cdot 10^{12}$ UFC/mL (tratamento 12), elaborado com 6% FY e 7%FA. Já para fator de crescimento e contagem final de bactérias lácticas, os maiores valores obtidos foram 1,52 e $2,2 \cdot 10^{12}$ UFC/mL, referente ao tratamento 6 (12%FY e 7%FA).

Os menores fatores de crescimento totais, para lactobacilos e bifidobactéria (FC_{CT} , FC_{CL} e FC_{CB}) foram 1,29; 1,28 e 1,32 respectivamente e ocorreram com o ensaio contendo somente 7% de farinha de amendoim como meio de fermentação (ensaio 5). Esse resultado era esperado, pois como o meio não possui farinha de yacon, apesar do amendoim ser rico em proteínas, carece de açúcares e oligossacarídeos disponíveis para o bom desenvolvimento celular das linhagens probióticas, que possuem requerimentos nutricionais específicos. Outros ensaios contendo diferentes níveis de yacon, rico em açúcares redutores e oligofrutoses (Santana e Cardos, 2008.) tiveram melhores fatores de crescimento do que aqueles sem yacon, como por exemplo o tratamento 4, 5 e o 7.

Tabela 2-4. Resultados obtidos para contagens dos probióticos nos meios com farinhas de yacon e amendoim, de acordo com DCCR.

Trat.	FY (%m/v)	FA (%m/v)	CT (LogUFC/mL)	FC_{CT}	CL (logUFC/mL)	FC_{CL}	CB (logUFC/mL)	FC_{CB}
1	-1 (1,75)	-1 (4)	11,6 ± 0,1	1,32	11,34 ± 0,05	1,3	11,2 ± 0,3	1,39
2	1 (10,25)	-1 (4)	11,9 ± 0,2	1,35	11,97 ± 0,03	1,37	11,4 ± 0,2	1,38
3	-1 (1,75)	1 (10)	12,3 ± 0,5	1,39	11,76 ± 0,59	1,35	12,01 ± 0,47	1,46
4	1 (10,25)	1 (10)	12,3 ± 0,5	1,4	8,24 ± 0,12	1,35	12,1 ± 0,7	1,47
5	-1,41 (0)	0 (7)	10,29 ± 0,06	1,29	10,00 ± 0,15	1,28	10,01 ± 0,01	1,32
6	1,41 (12)	0 (7)	12,57 ± 0,03	1,51	12,34 ± 0,06	1,52	12,34 ± 0,06	1,51
7	0 (6)	-1,41 (2,8)	12,1 ± 0,2	1,46	11,68 ± 0,14	1,46	11,7 ± 0,1	1,47
8	0 (6)	1,41 (11,2)	11,93 ± 0,08	1,40	10,95 ± 0,03	1,37	10,95 ± 0,03	1,37
9	0 (6)	0 (7)	12,0 ± 0,1	1,54	10,94 ± 0,01	1,38	11,9 ± 0,1	1,58
10	0 (6)	0 (7)	11,7 ± 0,1	1,55	10,95 ± 0,01	1,37	11,89 ± 0,02	1,55
11	0 (6)	0 (7)	11,9 ± 0,1	1,55	10,95 ± 0,01	1,38	11,93 ± 0,02	1,52
12	0 (6)	0 (7)	11,9 ± 0,0	1,56	11,11 ± 0,02	1,45	12,47 ± 0,03	1,59
13	0 (6)	0 (7)	11,98 ± 0,02	1,55	11,07 ± 0,02	1,44	12,42 ± 0,03	1,58

Trat: Tratamentos; FY: farinha de yacon; FA: farinha de amendoim; CT: contagem total; DP: desvio padrão; FC_{CT}: fator de crescimento para Contagem Total; CL: contagem de lactobacilos; FC_{CL}: fator de crescimento para Contagem de Lactobacilos; CB: contagem para bifidobacteria; FC_{CB}: Fator de crescimento para bifidobacterias e DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional).

Na tabela 5 observam-se os resultados obtidos no DCCR para o pH do meio fermentado, produção de ácido láctico, consumo de açúcares redutores (AR), consumo de açúcares redutores totais (ART).

Tabela 2-5. Resultados obtidos para pH, produção de ácido láctico, consumo de AR e ART na fermentação láctica de meio contendo farinhas de yacon e amendoim por linhagens probióticas segundo delineamento experimental DCCR.

Trat.	FY (%m/v)	FA (%m/v)	pH	Δ pH	Acidez (gAL/L)	PA (gAL/L)	Cons. AR (% rel)	Cons. AR (g/L)	Cons. ART (%rel)	Cons. ART (g/L)
1	-1 (1,75)	-1 (4)	3,65	1,41	6,65	2,73	23,9	2,29	67,5	8,14
2	1 (10,25)	-1 (4)	3,93	1,06	6,52	3,47	17,5	7,95	57,3	20,6
3	-1 (1,75)	1 (10)	3,95	1,63	5,22	2,54	56,3	0,09	72,0	9,22
4	1 (10,25)	1 (10)	4,12	1,16	8,52	5,06	26,9	11,24	39,8	12,39
5	-1,41 (0)	0 (7)	4,37	0,79	1,56	1,00	52,0	0,07	46,3	0,08
6	1,41 (12)	0 (7)	4,22	1,47	10,27	7,28	48,1	20,87	55,7	20,66
7	0 (6)	-1,41 (2,8)	3,6	1,43	8,2	7,16	38,0	14,16	47,7	14,68
8	0 (6)	1,41 (11,2)	3,7	1,34	7,63	6,20	31,7	11,33	56,5	18,84
9	0 (6)	0 (7)	3,9	1,41	7,63	3,34	38,3	13,29	77,9	12,91
10	0 (6)	0 (7)	3,95	1,48	7,54	2,86	39,1	13,6	77,2	12,72
11	0 (6)	0 (7)	3,93	1,28	7,54	3,05	35,8	13,87	75,5	12,18
12	0 (6)	0 (7)	3,95	1,38	6,20	3,34	37,3	14,54	75,5	13,11
13	0 (6)	0 (7)	3,93	1,26	6,49	3,15	36,5	14,31	76,3	12,75

*Trat: tratamento; FY: farinha de yacon; FA: farinha de amendoim; Δ pH: variação de pH=(pH_{inicial}-pH_{final}); Acidez (g ácido lac/L); Produção de ácidos(PA): PA=(Acidez_{final}-Acidez_{inicial}); Cons. AR (%rel): consumo relativo de açúcares redutores = ((AR_{inicial}-AR_{final})/AR_{inicial})*100; Cons. AR (g/L): consumo de açúcares redutores=(AR_{inicial}-AR_{final}); Cons. ART (%rel): consumo relativos de açúcares redutores totais=((ART_{inicial}-ART_{final})/ART_{inicial})*100; Cons. ART (g/L): consumo de açúcares redutores totais=(ART_{inicial}-ART_{final}).*

O tratamento com menor produção de ácidos (PA) foi o 5 (1,00 g/L) e o tratamento 6 foi o que teve maior produção (7,28g/L), sendo que estes ensaios apresentaram o menor e o maior crescimento celular respectivamente. Da mesma forma, e como esperado, o maior consumo de açúcares redutores (20,87 g/L de AR) ocorreu tratamento 6 e o menor no tratamento 5 (0,07 g/L) igual que o consumo de açúcares redutores totais (20,66 e 0,08 g/L para o tratamento 6 e 5, respectivamente). Gonzales-Montoya et al., 2016, comprovou o baixo teor de carboidratos totais e açúcares no amendoim, daí sua baixa capacidade fermentescível e a necessidade de suplementação com outras fontes de carbono, como por exemplo com yacon, que é rico em açúcares redutores, tornando-se um complemento adequado para fermentação probiótica no desenvolvimento de produtos proteicos substitutos de produtos fermentados à base de leite.

Para todas as respostas, foram ajustados modelos, e os coeficientes da regressão são apresentados na Tabela 6 e na tabela 7, a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os únicos modelos com bom ajuste aos dados experimentais foram os obtidos para FC_{CT} , FC_{CB} , o consumo de açúcares redutores e o consumo de açúcares redutores totais, pelos coeficientes de determinação (R^2) acima de 75% e pela análise de variância, em que o ajuste da regressão foi significativo, critérios considerados satisfatórios para confirmar a significância do modelo, segundo Rodrigues e Lemma (2014). Na Tabela 6 e 7 são mostrados os coeficientes de regressão para todos os modelos e, em negrito, são destacados os parâmetros significativos.

Tabela 2-6. Coeficientes de regressão e p- valor associados para o FC_{CT} , FC_{CL} e FC_{CB} .

Parâmetros	FC_T		FC_L		FC_B	
	Regressão	p-valor	Regressão	p-valor	Regressão	p-valor
Media/Interação.	1,55	0	1,40	0,00	1,56	0,00
X_1 (L)	0,04	0,06	0,05	0,05	0,03	0,15
X_1 (Q)	-0,09	0	-0,02	0,46	-0,07	0,01
X_2 (L)	0,01	0,8	-0,01	0,59	0,00	0,91
X_2 (Q)	-0,07	0,01	-0,01	0,65	-0,07	0,02
X_1X_2	-0,01	0,84	-0,02	0,59	0,01	0,87
R^2	0,83		0,49		0,75	

FC_{CT} : fator de Crescimento para Contagem Total em logUFC/mL, FC_C : fator de Crescimento para Contagem de lactobacilos em logUFC/mL e FC_{CB} : fator de Crescimento para Contagem de bifidobacterias em logUFC/mL.

Tabela 2-7. Coeficientes de regressão e p- valor associados para o pH, a produção de ácidos e o consumo de açucares redutores.

Parâmetros	Δ pH		PA (g AL/L)		Cons. AR (g/L)		Cons. ART (g/L)	
	Regressão	p-valor	Regressão	p-valor	Regressão	p-valor	Regressão	p-valor
Media/Interação.	3,15	0	1,36	0	13,93	0	12,74	0
X ₁ (L)	1,52	0,02	0,04	0,85	11,56	0	11,2	0
X ₁ (Q)	0	1	-0,21	0,33	-6,6	0,06	-2,87	0,19
X ₂ (L)	0,01	0,99	0,05	0,79	-0,73	0,79	-0,32	0,87
X ₂ (Q)	1,28	0,04	0,05	0,81	-4,32	0,18	3,55	0,11
X ₁ X ₂	0,45	0,53	-0,06	0,81	2,75	0,49	-4,65	0,11
R ²	0,7		0,16		0,78		0,87	

PA (g AL/L): produção de ácidos em gramas de ácido láctico por litro; Cons. AR(g/L): consumo de açucares redutores em gramas sobre litro.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7 e 8, a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), os termos quadráticos para farinha de yacon e farinha de amendoim foram significativos sobre o fator de crescimento para contagem total e o fator de crescimento para contagem de bifidobactérias, apresentando efeitos negativos, indicando que os maiores valores dos fatores de crescimento total e de bifidobactérias são obtidos na região central das concentrações das farinhas. Em relação ao consumo de açúcares redutores, apenas o termo linear da concentração de farinha de yacon foi significativo e mostra que um aumento da concentração da farinha de yacon favorece o aumento do consumo de açúcares redutores. As análises de variância para os modelos de regressão foram feitas e apresentadas na Tabela 8 abaixo.

Tabela 2-8. Análise de variância para o fator de crescimento da contagem total de probióticos (FCCT), o fator de crescimento da contagem de bifidobactérias (FCCB), para o consumo de açúcares redutores (Cons. AR), e o consumo de açúcares redutores totais (Cons. ART)

FCCT						
FV	SQ	gL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	0,09	5	0,02	6,67	3,97	0,01
Error	0,02	7	0			
Total	0,11	12				
R2	0,83					
FCCB						
FV	SQ	gL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	0,07	5	0,01	4,21	3,97	0,04
Error	0,02	7	0			
Total	0,1	12				
R2	0,75					
Cons. AR						
FV	SQ	gL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	371,88	5	74,38	5,164	3,97	0,03
Error	100,83	7	14,4			
Total	472,71	12				
R2	0,78					
Cons. ART						
FV	SQ	gL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	312,88	5	62,58	9,424	3,97	0,01
Error	46,48	7	6,64			
Total	359,36	12				
R2	0,87					

SQ: soma dos quadrados; gL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fcalc: F calculado e Ftab: F tabelado.

Observa-se na Tabela 9 que o modelo de regressão para o FCCT é significativo pelo Teste F, sendo que o Fcalc > Ftab para o modelo, além de apresentar um p-valor baixo. O ajuste do modelo foi verificado também pelo coeficiente de determinação (R²), sendo que o valor acima de 0,70 é considerado satisfatório para confirmar a significância do modelo (Rodrigues e Lemma, 2014) Os modelos de regressão codificados obtidos para o fator de crescimento total e de bifidobacterias estão expressos nas Equações 5 e 6.

$$FCCT = 1,55 + 0,04 * X1 - 0,09 * X12 + 0,01 * X2 - 0,07 * X22 - 0,01 * X1X2 \quad (5)$$

$$FC_{CB} = 1,56 + 0,03 * X1 - 0,07 * X12 + 0,00 * X2 - 0,07 * X22 + 0,01 * X1X2 \quad (6)$$

Como observado o modelo de regressão para o consumo de açúcares redutores (Cons. AR) e o consumo de açúcares redutores totais (Cons. ART) é significativo pelo Teste F, sendo que o $F_{calc} > F_{tab}$ para o modelo, além de apresentar um p-valor baixo. O ajuste do modelo também tem um coeficiente de determinação (R^2), com valor acima de 0,70.

Os modelos de regressão codificados obtidos para o consumo de açúcares redutores e açúcares redutores totais estão expressos nas Equações 7 e 8.

$$\text{Cons. AR (g/L)} = 13,9345 + 11,56 * X1 - 6,6 * X12 - 0,73 * X2 - 4,321 * X22 + 2,75 * X1X2 \quad (7)$$

$$\text{Cons. AR (g/L)} = 12,74 + 11,20 * X1 - 2,87 * X12 - 0,32 * X2 + 3,55 * X22 - 4,65 * X1X2 \quad (8)$$

A partir dos modelos gerados pelo DCCR para o *fator de crescimento para contagem total* e Cons. AR, as curvas de contorno foram construídas e são apresentadas na Figura 1.

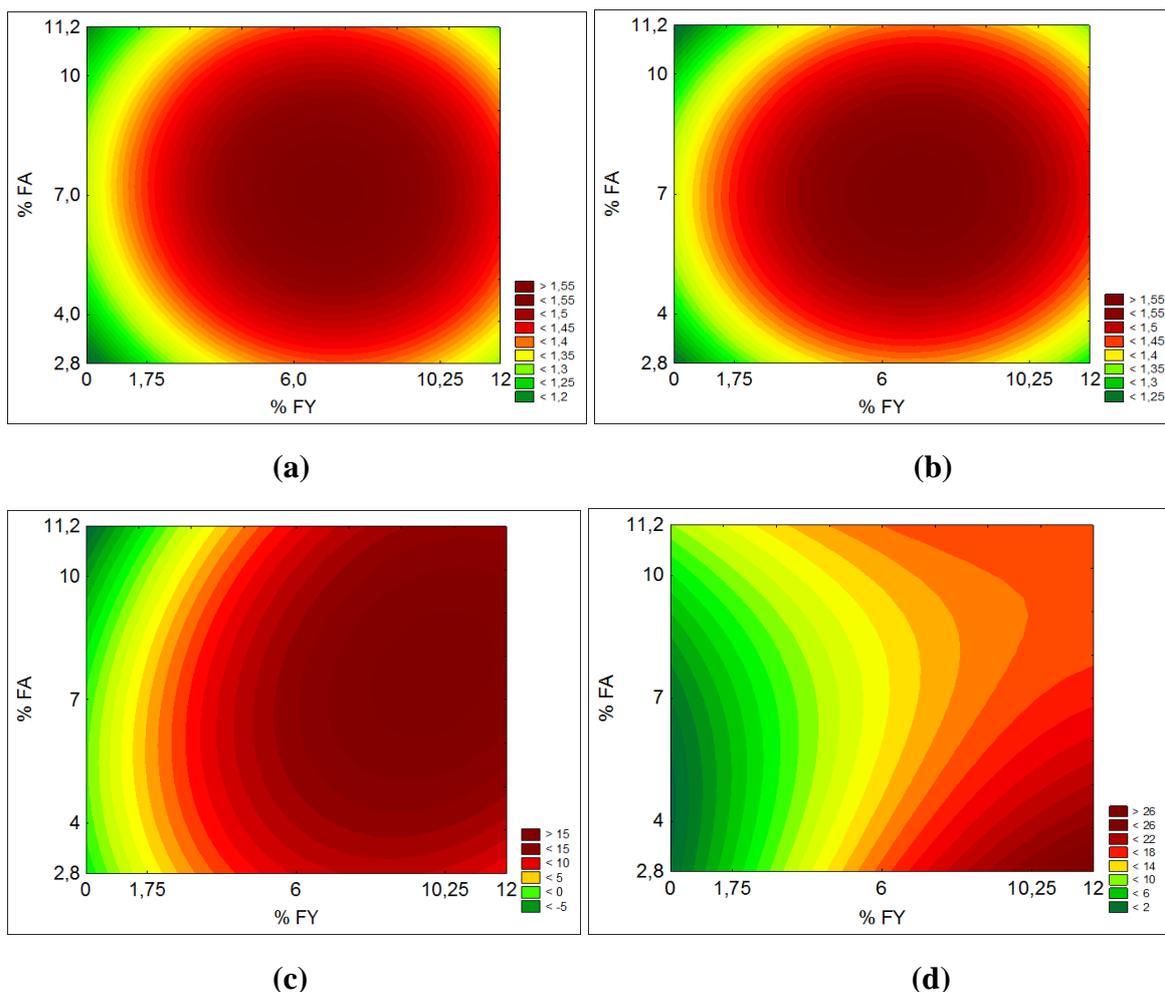


Figura 2-1. Curvas de contorno para o FCCT (fator de Crescimento para Contagem Total) em relação às variáveis %FY e %FA (a), FCCB (fator de Crescimento para Contagem de bifidobactérias) em relação às variáveis %FY e %FA (b), Cons. Açúcares redutores (AR) com respeito ao %FY e %FA (c) e Cons. Açúcares redutores totais (ART) com respeito ao %FY e %FA (d).

Ao analisar a Figura 1 é possível observar que, dentro dos limites deste estudo, os maiores fatores de crescimento (FC), ou seja, acima de 1,56 e 1,59 para a contagem total e de bifidobactérias, respectivamente, foram obtidos quando os meios de fermentação foram formulados dentro da faixa de 6-8% de FY e 6-8% de FA. Portanto, dentro dos tratamentos estudados, as formulações elaboradas de acordo com o ponto central do DCCR, contendo 6% de FY e 7% de FA são as que mais se aproximam desses valores de otimização em relação às contagens totais de probióticos e de bifidobactérias. Em média, foram obtidas contagens finais de 12 log UFC/mL e FC de 1,55 e 1,56 no ponto central, o ensaio 12 (contendo 6% FY e 7% FA) obteve o maior FC, sendo de 1,56 e 1,59 para contagem total e de bifidobactérias. Quanto maior seja o número de células viáveis

no produto final, espera-se que seu efeito funcional seja maior segundo Brasil (2008). De acordo com a legislação brasileira, uma das características de um alimento probiótico é que este deve conter acima de 8-9log UFC/mL por dose diária e que as células devem atingir o trato digestório em números elevados e viáveis de no mínimo 6 log UFC/mL para terem efeito funcional. Isto porque as bactérias probióticas que sobreviverem às drásticas condições do trato digestório deverão se aderir ao GALT para atuarem produzindo o efeito positivo em saúde esperado por elas.

A respeito do consumo de Açúcares Redutores (AR), a figura 1(c) mostra que a região de maior consumo ocorre entre 6 e 9 % de FA e 9 e 12% de FY. No entanto, o maior consumo de AR não significou maior crescimento probiótico, já que parte dos AR gastos não necessariamente foram utilizados para o crescimento celular, mas para produção de ácidos orgânicos e como precursores de formação de outras substâncias como exopolissacarídeos, já que como conhecido as bactérias lácticas em especial as bifidobactérias possuem genes que codificam a frutotransferase (enzima envolvida na biosíntese de frutana) para a formação de EPS dentro da sua via metabólica. Segundo Santana e Cardoso (2008) o yacon contém entre 10 e 14% de carboidratos (na maioria do grupo frutano) armazenados, encontrando-se em grande parte em forma de oligofrutoses de inulina (40-70% em base seca) tornando-se dos alimentos com maior conteúdo de oligofrutoses na natureza junto com a alcachofra Jerusalem, sendo, portanto, considerado como alimento funcional. Além da fonte de carbono, bactérias probióticas são altamente exigentes nutricionalmente. Estudos mostram que as fibras solúveis, amido resistentes, oligossacarídeos (como por exemplo as oligofrutoses) e dissacarídeos como a lactulose fornecem substratos para a microbiota conviva, afetando sua atividade metabólica e o crescimento, sendo relacionados principalmente ao crescimento de bifidobactérias e lactobacilos (Cummings et al., 2002; Magalhães et al., 2011). Para o consumo de açúcares redutores totais como foi visto na tabela 7, teve um bom ajuste e a adição de yacon tem um efeito significativo, sendo a zona de maior consumo de açúcares redutores totais aquelas com maior concentração de %FY.

3.2. Validação do modelo

Na Tabela 9 são apresentados os teores de FY e FA utilizados para a validação e as respostas: crescimento total, crescimento de bifidobactérias, consumo de açúcares

reduzirese consumo de açúcares redutores totais, bem como os valores preditos pelo modelo e o erro ou desvio relativo. Observou-se que os valores preditos pelo modelo foram próximos aos experimentais, com baixos desvios relativos para o FC_{CT} e para FC_{CB}. Para consumo de AR, os valores preditos pelo modelo também ficaram próximos dos valores experimentais, com desvios relativos abaixo de 20%, que podem ser considerados baixos, levando em consideração a variabilidade inerente aos processos fermentativos. Isto indica que os modelos foram validados, tanto para o a fator de crescimento para contagem total e contagem de bifidobacterias, quanto para consumo de açúcares redutores na fermentação de farinha de yacon e amendoim por quatro linhagens probióticas.

Tabela 2-9. Resultados da validação dos modelos para fator de crescimento para contagem total, fator de crescimento para bifidobactérias (FCCT) e para consumo de açúcares redutores

Trat	FY (%m/v)	FA (%m/v)	Exp. FC _{CT}	Predito FC _{CT}	Desvio rel. (%)
T1	0,24 (7)	0 (7)	1,56	1,55	0,29
T2	0,94 (10)	0 (7)	1,53	1,51	1,09

Trat	FY (%m/v)	FA (%m/v)	Exp. FC _{CB}	Predito FC _{CB}	Desvio rel. (%)
T1	0,24 (7)	0 (7)	1,66	1,56	5,83
T2	0,94 (10)	0 (7)	1,56	1,53	2,16

Trat	FY (%m/v)	FA (%m/v)	Exp. Cons.AR (g/L)	Predito Cons.AR (g/L)	Desvio rel. (%)
T1	0,24 (7)	0 (7)	18,82	15,13	19,59
T2	0,94 (10)	0 (7)	20,05	16,45	17,94

Trat: Tratamento; FY: farinha de yacon; FA: farinha de amendoim; FC; fator de crescimento; CT: contagem total, CB: contagem de bifidobactérias, D. relativo: desvio relativo; cons. AR (g/L): consumo de açúcares redutores em gramas por litro.

3.3. Estudo cinético do crescimento total de probióticos

Observam-se na figura 1, os resultados das cinéticas de crescimento em relação a Contagem total de probióticos e contagem diferenciada de lactobacilos (*L. acidophilus* LA14, *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC81 e *L. rhamnosus* (LR32)

durante 6 horas de fermentação a 37°C em meios contendo farinha de yacon e/ou farinha de amendoim, de amostras retiradas a cada 2 horas, segundo o delineamento experimental DCCR adotado neste estudo.

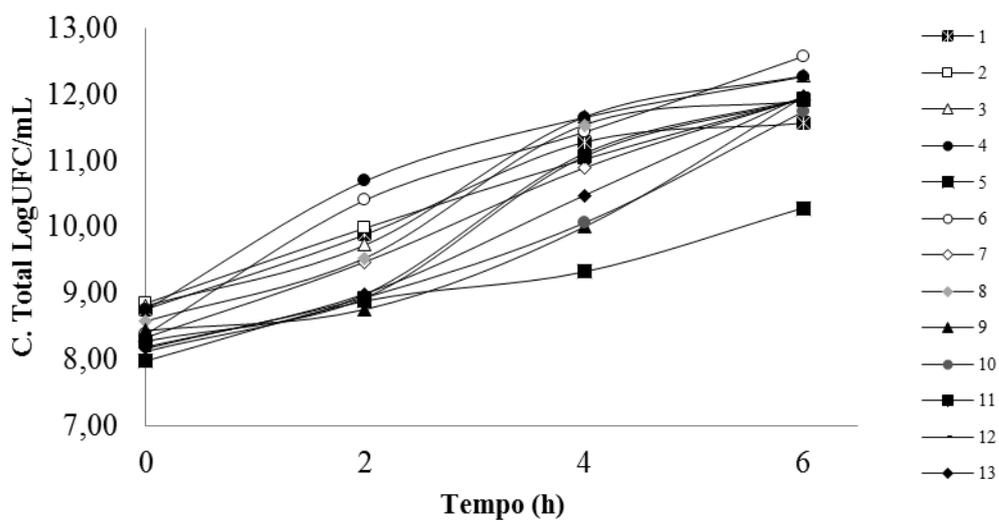
Aproximadamente, todos os tratamentos (T1 a T13) tiveram aumento nas contagens em 3 ciclos logarítmicos em relação à concentração inicial de células inoculadas. As contagens finais de todos os tratamentos foram elevadas, sendo maiores que 10 logUFC/mL satisfazendo as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de no mínimo 8-9 logUFC/porção.

Espirito-Santo et al. (2015) fez pesquisas utilizando um meio de 10% de soja liofilizada em água e culturas de *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. animalis* subsp. *lactis*. Esses autores obtiveram contagens de aproximadamente 10⁹-10¹⁰ UFC/mL ao empregar culturas puras, em tempos de fermentação que variaram entre 15-24 horas. Ao realizar fermentações com cultura mista de *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. animalis* subsp. *lactis* o tempo final de fermentação foi reduzido a um intervalo variando de 5 a 9 horas com contagens semelhantes. Estudos realizados por Mondragón-Bernal et al. (2017) e Teixeira (2017), fermentando extrato de soja por culturas mistas de lactobacilos e *Bifidobacterium longum* BL04 obtiveram contagens de 10⁹ em 16 horas e 10¹⁰ em 10 horas de fermentação, respectivamente. Mondragón-Bernal (2004), assim como neste estudo, também observou que quando os microrganismos se encontram em simbiose o tempo de fermentação foi reduzido de 24 horas (linhages puras) para 16 horas para obter a mesma concentração de células probióticas e o mesmo pH final. Cunha et al. (2018) ao fermentar resíduos agroindustriais de batata e água de maceração de milho com *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 puro obteve contagens de 10¹⁰ UFC/mL após 70 horas de fermentação. Demonstrando assim que a simbiose entre diferentes espécies de microrganismos confere um efeito positivo no crescimento celular e redução do tempo de fermentação.

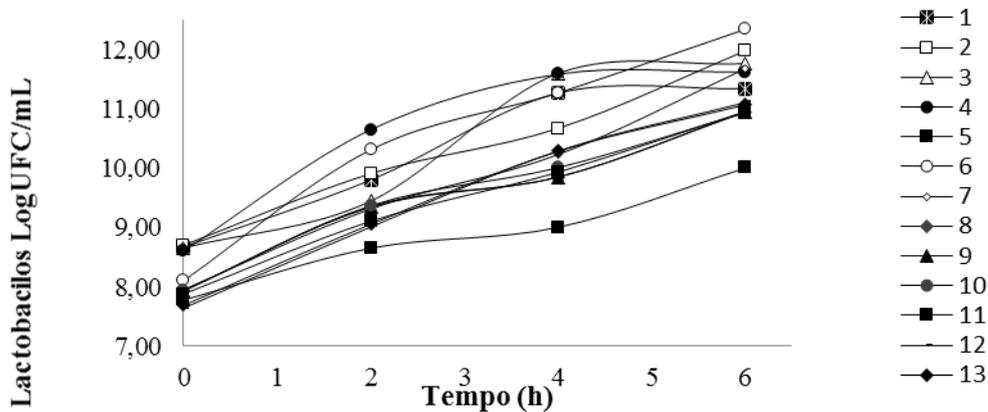
Segundo Santana e Cardoso (2008) o yacon contém de um 14 a 10% de carboidratos armazenados, destes a grande maioria encontram-se na forma de oligossacarídeos de inulina, ou oligofrutoses (40-70% em base seca), substâncias que estimulam ou favorecem o crescimento seletivo de agentes probióticos e que proporcionam um efeito sinérgico positivo na saúde de quem os consuma

simultaneamente, A relação sinérgica entre prebióticos e probióticos é mais conhecida com 'simbiose'. Portanto, o yacon, alimento considerado funcional pelo seu alto teor de oligossacarídeos prebióticos e junto com agentes probióticos, possui o potencial para o desenvolvimento de alimentos simbióticos. Pode-se por tanto, estabelecer que a presença do yacon influenciou a simbiose entre as linhagens inoculadas e os oligossacarídeos presentes no meio para o mais rápido crescimento das culturas probióticas e as elevadas contagens finais. Da mesma forma, o amendoim, caracterizado pelo elevado teor proteico (33%), e a sua composição de aminoácidos essenciais, entre eles cisteína, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina e hestidina, importantes para o desenvolvimentos de bactérias devido a sua limitada habilidade de sintetizar tais compostos. Sendo assim o amendoim conjunto com o yacon formaram um meio balanceado nutricionalmente para o desenvolvimento de todas as linhagens ali contidas. As relações simbióticas entre linhagens de lactobacilos e a bifidobactéria também podem ser compreendidas, pois, por um lado, os lactobacilos possuem enzimas proteolíticas que ajudam na digestão das proteínas do amendoim, biodisponibilizando peptídeos e aminoácidos para as bifidobactérias que são pobres em peptinases. Enquanto as bifidobactérias possuem maiores complexos enzimáticos do tipo inulinasas e/ou ou b(1-2) frutosidases (Biedrzycka e Bielecka, 2004) fermentando seletivamente os frutanos, preferencialmente a outras fontes de carboidratos, como o amido, a pectina ou a polidextrose (Fooks, Fuller, Gibson, 1999).

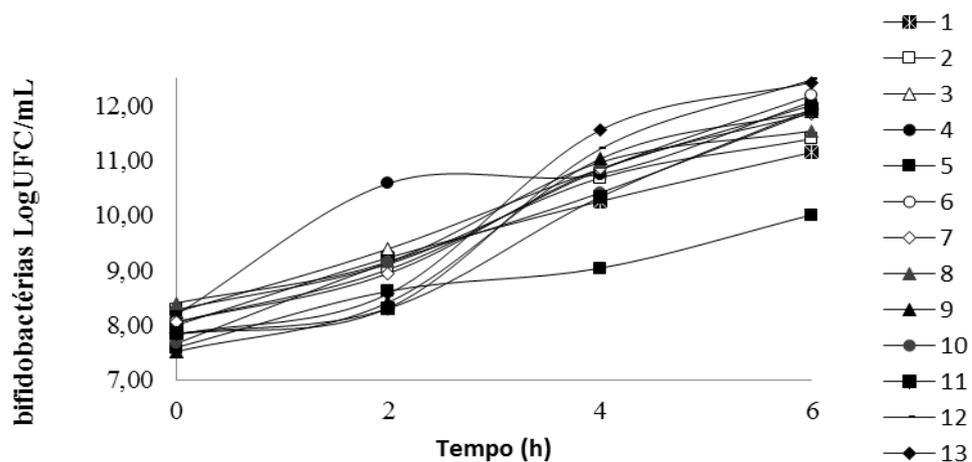
Os valores de acidez titulável obtidos durante o processo de fermentação, quantificados em gramas de ácido lático por litro de produto (g de ác. Lático/L), juntamente com os resultados de concentração de açúcares redutores totais (g/L), estão representados na Fig 2.



(A)



(B)



(C)

Figura 2-2. Contagem Total Log UFC/mL em relação ao tempo (A), crescimento de lactobacilos em 6 horas de fermentação (B) e crescimento de bifidobactérias em 6 horas (C).

As variações da acidez (g de ác. láctico/L), pH do meio e concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação são apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5

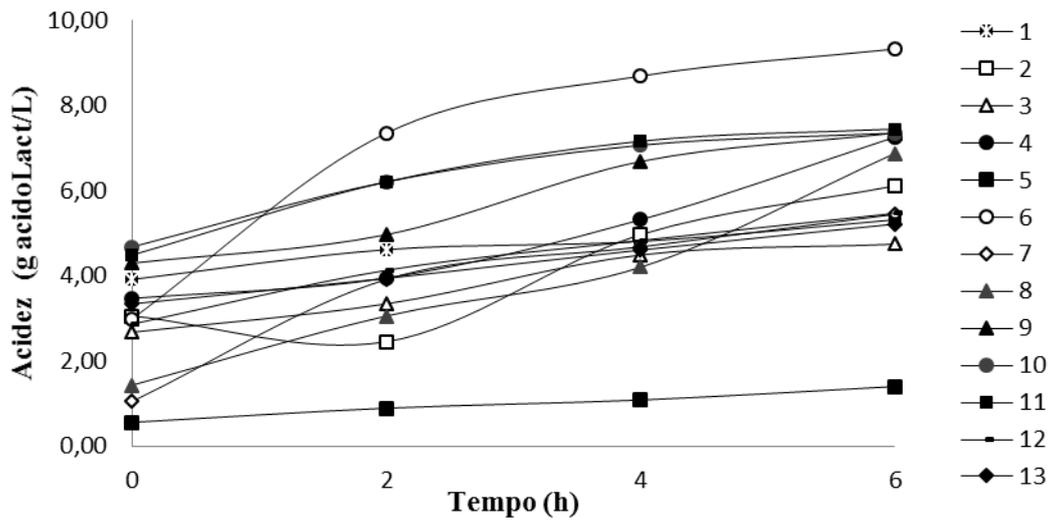


Figura 2-3. Cinética de acidez titulável (g ácido láctico/L) durante a fermentação para cada tratamento do DCCR.

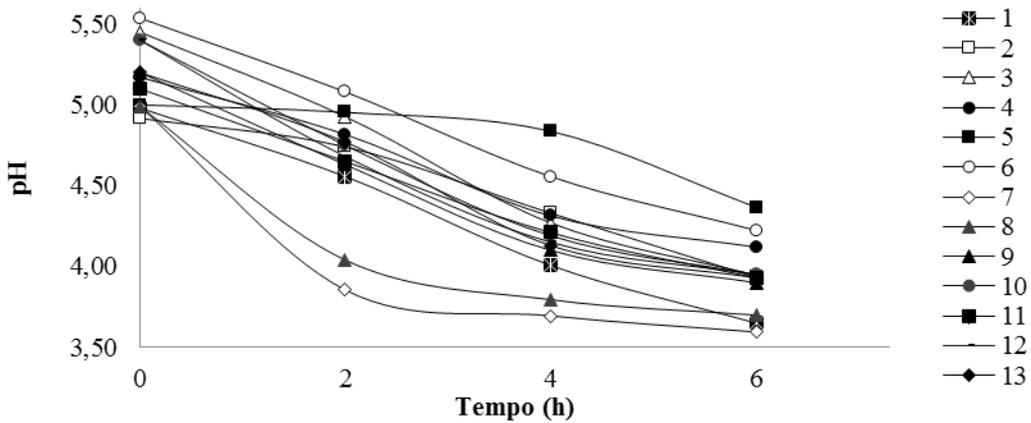


Figura 2-4. Variação do pH do meio durante a fermentação para os tratamentos do DCCR.

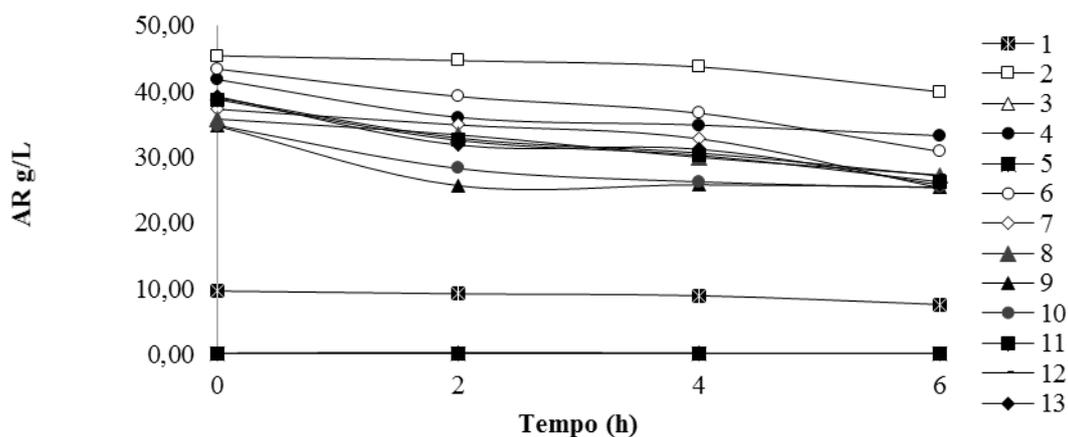


Figura 2-5. Cinética de consumo de açúcares redutores (AR)(g/L) durante a fermentação para cada tratamento do DCCR.

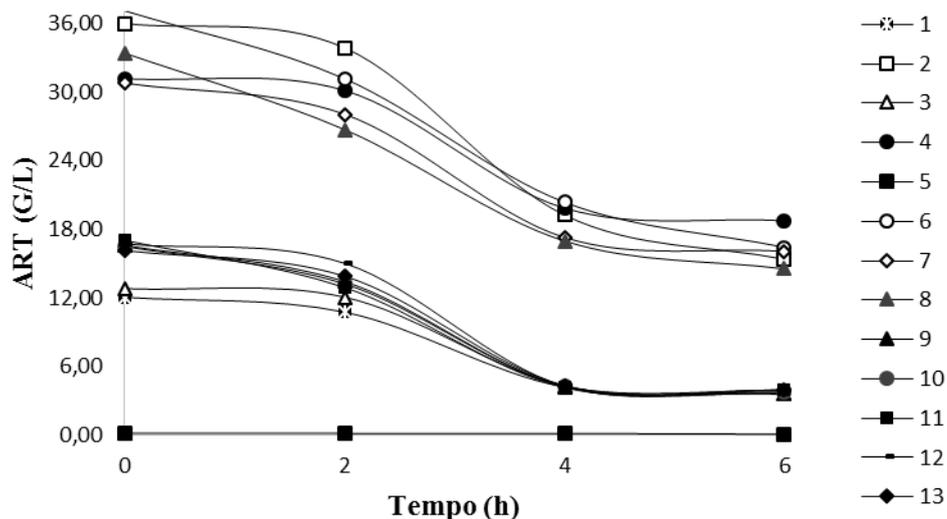


Figura 2-6. Cinética de consumo de açúcares redutores totais (ART)(g/L) durante a fermentação para cada tratamento do DCCR.

O tratamento 6 (12%*m/v* FY e 7%*m/v* FA), foi observada a maior produção de ácidos orgânicos (9,3 g ácido lact/L), corroborando com os resultados de maior crescimento de bactérias lácticas, além de maior disponibilidade de substrato. As menores concentrações de acidez podem ser observadas nos tratamentos 5 e 3 (1,56 e 5,22 g ácido lático/L), os quais tiveram menor adição de farinha de yacon. Mondragón-Bernal et al. (2012) e Teixeira (2017), em seus estudos, utilizando extrato de soja fermentado por *Lactobacillus paracasei* LBC-81 e *Bifidobacterium longum* BL-04 e *Lactobacillus rhamnosus* LR32, obtiveram uma acidez titulável em ácido lático de

17,9 g/L e 11g/L em um tempo de fermentação maior (12 horas), com uma proporção de bactérias lácticas e bifidobactérias de 40:60, com 12g/100mL de extrato de soja e sem agitação, o qual pode justificar a maior produção de acidez do tratamento 6 quando comparado com os outros tratamentos.

Em relação ao pH do meio, os valores ao final da fermentação situaram-se entre 3,6 e 4,37 para o tratamento 7 e 5, respectivamente. Mondragón-Bernal et al. (2017) após 16 horas de fermentação de extrato de soja por agentes probióticos, obteve meios fermentados com maiores pHs oscilando entre 4,36 e 4,98.

O maior consumo de açúcares redutores foi apresentado pelo tratamento 6, no qual a redução de açúcares redutores foi de 20,87g/L até o final da fermentação. Esse resultado era esperado, já que foi o tratamento que teve maior crescimento celular e produção de ácidos. Nos tratamentos 1, 3 e 5, foram verificados os menores teores e consumo de açúcares redutores, uma vez que foram os tratamentos com menores concentrações de farinha de yacon. Estudo realizado por Mora-Escobedo et al., 2016, mostrou que o amendoim tem baixa porcentagem de carboidratos.

3.4. Produção de ácidos orgânicos

Na tabela 10 são apresentados os resultados obtidos mediante HPLC para a produção de ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico para os tratamentos utilizados na validação da matriz do delineamento experimental.

Tabela 2-10. Concentrações dos ácidos no tempo inicial e final da fermentação expressados em g/L.

TEMPO (h)	AMOSTRA	Ac. (g/L)	Lático (g/L)	Ac. Acético (g/L)	Ac. Propiônico (g/L)
0	T1	3,854 ± 0,72	11,561 ± 10,03	1,278 ± 0,12	
0	T2	4,611 ± 0,77	10,301 ± 5,78	1,468 ± 0,04	
8	T1	6,721 ± 0,52	36,184 ± 5,93	1,425 ± 0,17	
8	T2	7,447 ± 0,70	48,039 ± 4,86	1,693 ± 0,16	

O tratamento 1 (7 %FY e 7 %FA) apresentou produção de ácido láctico de 2,867 g/L, valor semelhante ao observado no tratamento 2 (10 %FY e 7 %FA) que atingiu 2,836 g/L. Após 8 horas de fermentação o tratamento 2 (10 %FY e 7 %FA) exibiu uma concentração máxima de ácido láctico de 7,447 g/L. Cunha et al. (2018) fermentou

farinha de batata e água de maceração de milho por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 e obteve 183,8 g/L de ácido láctico, entretanto seu meio fermentado possuía maiores concentrações de substratos (220 g/L de farinha de batata e 55 g/L de água de maceração) e empregou-se um tempo de fermentação superior (72 h).

Já para a produção dos outros ácidos orgânicos o tratamento 2 apresentou uma maior concentração final de ácido acético (48,039 g/L) e de ácido propiônico (1,693 g/L). A concentração máxima de ácido acético alcançada por Ngome et al. (2017) ao fermentar soro láctico por *Lactobacillus helveticus* e *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 foi inferior à apresentada neste estudo (3,10 g/L), entretanto a concentração de ácido propiônico foi superior (3,78 g/L).

3.5. Testes de digestibilidade *IN VIVO*

Foram realizadas análises de viabilidade celular (contagem no início e fim do processo digestivo em logUFC/mL) e a taxa de sobrevivência. Os resultados encontram-se detalhados na Tabela 11.

Tabela 2-11. Resultados do teste de resistência às condições simuladas do trato digestório humana durante 8 h de digestão.

Tempo (h)	Tratamento	Inóculo		Tratamento 1		Tratamento 2	
		CT (log UFC/mL)	% Sobrev.	CT (log UFC/mL)	% Sobrev.	CT (log UFC/mL)	% Sobrev.
Contagem Total (Log UFC/mL)							
0,08	Saliva (pH 6)	11,22		13,4		13,07	
1	Suco gástrico (pH 1,2)	8,62	76,8	9,33	69,6	9,3	71,2
3	Suco intestinal pH(8.0)	7,46	66,5	8,28	61,8	8,19	62,7
4	Suco inst+pancr pH (8.0)	5,9	52,6	7,41	55,3	7,38	56,5
8	Suco inst+pancr pH (8.0)	5,39	48	7,11	53,1	7,08	54,2
Lactobacilos (Log UFC/mL)							
0,08	Saliva (pH6)	11,19		12,98		12,96	
1	Suco gástrico (pH 1,2)	8,09	72,3	9,16	70,6	9	69,4
3	Suco intestinal pH(8.0)	7,43	66,4	8,16	62,9	8,11	62,6
4	Suco inst+pancr pH (8.0)	5,61	50,1	6,64	51,2	6,89	53,2
8	Suco inst+pancr pH (8.0)	4,31	38,5	6,49	50	6,31	48,7
Bifidobactérias (Log UFC/mL)							
0,08	Saliva (pH6)	10,1		13,19		12,45	
1	Suco gástrico (pH 1,2)	8,47	83,9	8,84	67	8,99	72,2
3	Suco intestinal pH(8.0)	7,26	71,9	7,68	58,2	7,44	59,8
4	Suco inst+pancr pH (8.0)	5,58	55,2	7,33	55,6	7,21	57,9
8	Suco inst+pancr pH (8.0)	5,35	53	6,98	52,9	7,01	56,3

*Amostra 1: 7%FY e 7%FA; Amostra 2: 10%FY e 7%FA; CT: contagem total expressado em Log UFC/mL; % Sobrev: porcentagem de sobrevivência = (100-%de perda; onde %de perda= $[(CT_{inicial}-CT_{final})/CT_{inicial}]*100$).*

Os tratamentos 1 (7%FY e 7%FA) e 2 (10%FY e 7%FA), fermentados e após digestão em condições simuladas do trato digestório humano apresentaram uma concentração de 7,11 e 7,08 logUFC/mL para a contagem total, valores acima do exigido pela legislação brasileira, que determina um mínimo de 6 logUFC/mL em estado viável após ingestão para terem efeito funcional de colonização e aderência às paredes intestinais (Brasil, 2008). As taxas de sobrevivência foram de 53 e 54% respectivamente. Mondragón-Bernal (2009) realizou testes digestivos *in vitro* em bebida simbiótica a base de soja utilizando igual tipo e proporção de mistura de probióticos e, no seu estudo, obteve contagens totais e de bifidobacterias entre 6,2-8,8 Log UFC/mL ao final da digestão, sendo todos resultados próximos.

3.6. Testes de hidrofobicidade

A porcentagem de hidrofobicidade é uma medida indireta da capacidade de aderência dos lactobacilos, bifidobacterias ou outros microrganismos ao GALT (Tecido Linfoide Associado ao Intestino), importante característica que determina a funcionalidade dos agentes probióticos (Beachey, 1981). Uma vez os probióticos se aderem ao sítio ativo nas paredes do intestino, é ali que realizam sua atividade metabólica como produção de AGCC (Ácido Graxos De Cadeia Curta), produção de biocinas, síntese de vitaminas e enzimas, entre outros aspectos considerados como de efeito benéfico à saúde do hospedeiro (Ferreira e Teshima, 2000; Lourens-Hattingh et al., 2001). Quanto mais hidrofóbica, maior será a capacidade de aderência da bactéria. Na Figura 5, encontra-se representada a porcentagem hidrofobicidade obtida para os microrganismos puros, em misturas utilizados neste estudo e da bebida fermentada obtida usando meio com 7% FY e 7%FA.

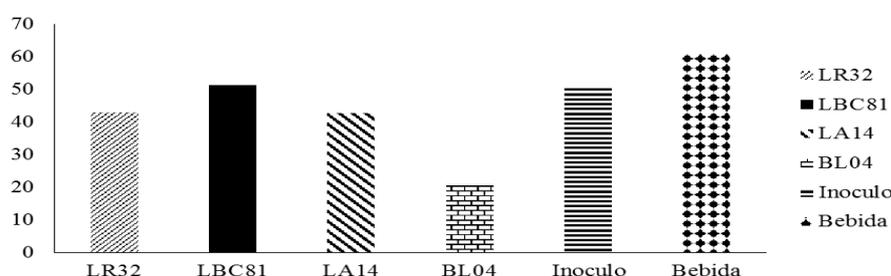
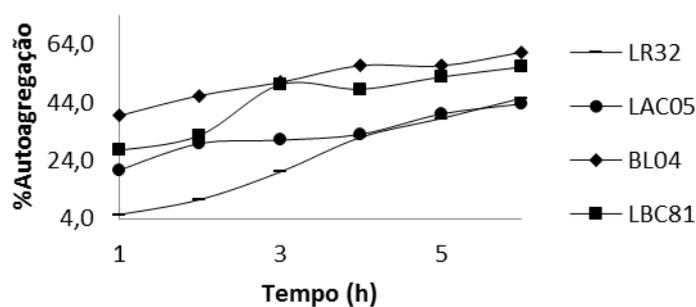


Figura 2-7. Porcentagem de Hidrofobicidade (%H) das linhagens puras de LR (*Lactobacillus rhamnosus* LR32), LBC (*Lactobacillus paracasei* supsp *paracasei*. LBC81), BL (*Bifidobacterium longum* BL04), LA (*Lactobacillus acidophilus* LA14), do inoculo da mistura de LR:LBC:LA (*Lactobacillus acidophilus* LA14), do inoculo da mistura de LR:LBC:LA:BL na proporção de 10:15:15:60, e da bebida fermentada contendo 7%FY e 7 %FA.

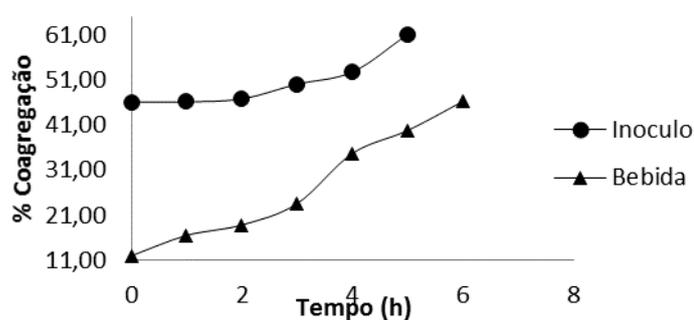
Das cepas puras o LBC81 foi o que apresentou maior porcentagem de hidrofobicidade (%H) (51,2%). O LR32 e o LA14 tiveram 43%H e a BL04 com 20,5% teve a menor hidrofobicidade. O inóculo com a mistura probiótica teve 51%H e a bebida obteve a maior %H (60,8%). Segundo o protocolo descrito por Felten et al (1999), a hidrofobicidade pode ser classificada como: alta (71-100%), média (36-70%) e baixa (0-35%). Sendo assim, a maioria das cepas apresentaram hidrofobicidade media, à exceção da BL04, que tem hidrofobicidade baixa. Segundo Barbosa et al., (2005) o *B. longum* apresenta baixa hidrofobicidade (18%) quando comparado com *B. lactis* (66%). Isso se deve principalmente às relações entre cargas superficiais da estrutura celular, sendo que as cargas negativas relacionadas às adisinas da *B. lactis* e os receptores do hospedeiro formam uma força de repulsão maior que as forças de coesão da sua hidrofobicidade. Além que a presença de glico-proteínas na superfície celular faz com que as cargas negativas diminuam, causando uma alta hidrofobicidade, como é o caso do *B. lactis* Bb12, e a presença de polissacarídeos aumenta essa relação de cargas negativas, aumentando as forças de repulsão e portanto causam uma baixa hidrofobicidade como é o caso da *B. longum* BL04 (Pelletier, 1997).

3.7. Testes de Autoagregação e co-agregação

Foi demonstrado que o fenômeno de autoagregação está associado a múltiplos mecanismos moleculares, as capacidades de autoagregação e adesão estão associadas a um fenótipo na membrana celular, o Agg+. O Agg+ é uma proteína que converte a superfície celular bacteriana em uma superfície aderente para as células doadoras, causando agregação ou aglutinação, facilitando a adesão na matriz das células eucarióticas. Quando esta proteína está presente e além se tem pouca concentração da proteína Agg-, tem-se um percentual de autoagregação maior e portanto adesão maior (Del rei et al., 1998; KOCH et al, 2008). Na Figura 6 é ilustrado o comportamento de autoagregação de cada linhagem, Como observado, com 61,3% a BL04 apresentou o maior %A, devendo-se à alta concentração do Agg+ presente na sua membrana celular tal e como foi demonstrado por Del rei et al., (1998) e o LA14 apresentou o menor percentual (43%) indicando uma possível baixa concentração de Agg+.



(a)



(b)

Figura 2-8. Porcentual de autoagregação (%A) do LR32, LA14, BL04, LBC81, o inoculo misto na proporção de 10:15:15:60, e da bebida fermentada contendo 7%FY e 7 %FA (a) e porcentual de co-agregação do inoculo na proporção de 10:15:15:60, e da bebida fermentada contendo 7%FY e 7 %FA (b).

Rendon (2008) realizou uma pesquisa com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti*, obtendo %A de 80% aproximadamente em 5 horas de ensaio, resultado próximo ao encontrado nesse estudo em 6 horas de experimento.

A capacidade de co-agregar é de suma importância nas bactérias probióticas, já que devido a esta, elas conseguem formar uma barreira no intestino e impedem a colonização por patogênicos (Del Ré et al., 1998). O ensaio mostrou que os agente probióticos utilizados no estudo tem boa capacidade de coagregação, 61 e 43% para o inoculo e a bebida respectivamente, resultados considerados superiores aos encontrados em outros estudos como por exemplo ao obtido por Kós et al., (2003) que teve um porcentagem de co-agregação entre *Lactobacillus acidophilus* M92 e *Enterococcus faecium* L3 de, aproximadamente, 19,46% e ao resultado de Redondo (2008), que em 5 horas de experimento alcançou uma co-agregação entre *Enterococcus faecium* CRL 183 e o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 de 25,4%.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a mistura probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* (LR32), *Lactobacillus acidophilus*(LA14), *Lactobacillus paracasei subspparacasei* (LBC81) e *Bifidobacterium longum* (BL04) pode fermentar eficazmente o meio composto por farinha de yacon e de farinha de amendoim, sendo a melhor formulação em termos de crescimento celular contendo 7% FY e 7% FA. Os protótipos desenvolvidos neste estudo apresentaram contagens probióticas em números elevados e dentro das exigências legais. Foram demonstradas as características de funcionalidade do produto simbiótico em relação à resistência dos probióticos inoculados às condições simuladas do trato digestório humano, com possível capacidade de aderência ao tecido linfoide associado ao intestino com sítios de ação específico no trato gastrointestinal.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Alimentos com Alegações de Propriedade Funcional e ou de Saúde” Resolução nº18. Brasil, 2008.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 19. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2012.
- MARTINS, R. Tendências e oportunidades em alimentos e bebidas em frente a um consumidor cada vez mais exigente. **Evento Food ingredients South America**, celebrado na Transamérica Expo Center, São Paulo. 22-24 de agosto do 2017.
- BARBOSA, FH; DA SILVA, AM; DOS SANTOS, M; FLAVIANO, RN. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de biologia y ciencias de la tierra**, v.5, n.002, 2005.
- BERNUCHI, B.S.P.; LOURES, C.M.G.; LOPES, S.C.A.; OLIVEIRA, M.C.; SABINO, A.P.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; LACERDA, I.C.; NICOLE, J.R.; OLIVEIRA, E.S. Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. **Food Science and Technology**, v.80, p.41-347, 2017.
- BORIS, S.; SUAREZ, J.E; BARBE´S, C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **J. Appl. Microbiol.** , v.83,p. 413–420, 1997.
- BRASIL. Ministério Da Agricultura E Do Abastecimento. instrução normativa nº 36, de 31 de outubro de 2000. Dispõe o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, [Internet]. Brasília (DF): Diário Oficial da União, nº. 215; 2000, novembro 8. Disponível em: http://www.lex.com.br/doc_19408_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_36_DE_31_DE_OUTUBRO_DE_2000.aspx.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. os procedimentos a serem adotados para a avaliação de segurança, registro e comercialização de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde..

[Internet]. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2002, Janeiro 9. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjIIMw%2C%2C>.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares, as quantidades de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos contidas nos suplementos alimentares. [Internet]. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2018; nº. 144, Julho 27. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do-1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917.

- CAETANO, F. R. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. **Nutrients**. Basel: Mdpi Ag, v.8, n.7, p.13, 2016.

- CUNHA, M.C.; MASOTTI, M.T.; MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; ALVES, J.G.L.F. Highly Efficient Production Of L (+)-Lactic Acid Using Medium With Potato, Corn Steep Liquor And Calcium Carbonate By Lactobacillus Rhamnosus Atcc 9595. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.35, n.3, p. 887-900, 2018.

- CURBELO, Y.G., GARCÍA, Y., LÓPEZ, A. Y BOUCOURT, R. Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. **Rev Cuba Cienc Agrícola**, v.39, n.2, p.19-140, 2005.

- DE MAN, J. C., ROGOSA, M. & SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J Appl Bacteriol**, v.23, p.130–135, 1960.

- DEL RE, B.; Busetto, A.; VIGNOLA, G.; SGORBATI, B.; PALENZONA, D. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.27, p.307-310, 1998.

- ESPÍRITO-SANTO AP, MOUQUET-RIVIER C, HUMBLLOT C, CAZEVIEILLE C, ICARD-VERNIÈRE C, SOCCOL CR, GUYOT JP. Influence of cofermentation by amylolytic Lactobacillus strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. **Food Research International**, v.57, p.104-113, 2014;

- GONZÁLEZ-MONTOYA M, CANO-SAMPEDRO E, MORA-ESCOBEDO R. Péptidos bioactivos de leguminosas como agentes terapéuticos anticancerígenos. **Int J Cancer Clin Res**, p. 4-8. 2017.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Zenebon O, Pascuet NS, Tiglea P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.
- KOCH, K.; BHUSHAN, B.; BARTHLOTT, W. Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces. **Soft Matter**, v.4, p.1943-1963, 2008.
- KOS, J; S US'KOVIC', S; VUKOVIC', M; ~ IMPRAGA, S; FRECE, J; MATOS'IC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol.**, v.94, p.981–987, 2003.
- LOZANO, M.G. 2016. Amendoim (*Arachis hypogaea* L.): composição centesimal, ácidos graxos, fatores antinutricionais e minerais em cultivares produzidas no estado de são Paulo. **Dissertação mestrал em ciência e tecnologia de alimentos**, Universidade de São Paulo, escola superior de agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba Brazil.
- MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry.**, v.31 n. 3, p. 426-428, 1959.
- MISHRA, V.; Y PRASAD, D.N. Aplicación de métodos in vitro para la selección de cepas de *Lactobacillus casei* como probióticos potenciales. **Int J Food Microbiol**, v. 103, p.109–115. 2005.
- MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; TEIXEIRA, M.A.; ALVES, J.G.L.F.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F.F. Stability and functionality of synbiotic soy food during shelf-life. **Journal of Functional Foods**, v.35, p.134-145, 2017.
- MONDRAGÓN-BERNAL OL, MAUGERI FF, ALVES JGLF, RODRIGUES MI. Synbiotic Soy Beverages: Principles and Sensory Attributes. In: Hui YH, Evranuz EÖ. (Org.) **Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology**. Flórida: CRC Press; pp. 103-130, 2012.

- MONDRAGON-BERNAL, O. L. 2009. Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja. **Tese de doutorado em engenharia de alimentos**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, universidade de Campinas.
- MONDRAGÓN B., O. L. 2004. Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos. Campinas. **Dissertação mestrado em Engenharia de Alimentos**, facultade de Engenharia de Alimentos, universidade de Campinas.
- NGOME, M.T.; O.L.; ALVES, J.G.L.F.; PICCOLI, R.H.; DOMINGO, E.C.; PINTO, S.A.; MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-. **Acta Scientiarum**, v. 39, p. 543-550, 2017.
- NUTRACETICAL WORLD. Tendencias clave en alimentos y bebidas funcionales para 2019, Estados Unidos, 2019. Disponível em: https://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2018-11/view_features/key-trends-in-functional-foods-beverages-for-2019. Acessado 01/02/2019.
- PANGHAL, A., JANGHUB, S., VIRKARA, K., GATA, Y., KUMARA, V., CHHIKARAA, N. Potential non-dairy probiotic products-A healthy approach. **Food Bioscience.**, v.21, p. 80- 89, 2018.
- PELLETIER, C., BOULEY, C.C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P. & BELLON-FONTAINE, M-N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1725-1731. 1997.
- PATRA, J.K., DAS, G., PARAMITHIOTIS, S. AND SHIN, H.S. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: a review. **Frontiers in Microbiology.**, v.7, p.1493, 2016.
- REDONDO, N. Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416. **Dissertação para mestre em Alimentos e Nutrição**. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, São Paulo, Brasil. 2008.

- REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R.; COOK, R.L. Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian, J. Microbiol.*, v.34,p. 344–351, 1988.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Experimental Design and Process Optimization. CRC Press - Taylor and Francis Group, 1ª Ed., 2014.
- RODRIGUES, F.C.; CASTRO, A.S.B.; DUARTE, M.; FERREIRA, C.L. Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): produção e caracterização química. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.70, n.3. p.290-296, 2011.
- 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.
- SOUZA ERN, TEBALDI, VMR, PICCOLI, RH. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Rev Bras PI Med.**, v.17, p. 528-533, 2015.
- SWAIN, M.R., ANANDHARAJ, M., RAY, R.C. AND PARVEEN, R. Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. **Biotechnology Research International**, p.19, 2014.
- TAMANG, J.P. Naturally fermented ethnic soybean foods of India. **Journal of Ethnic Foods**, v.2, n.1, p.8-17, 2015.
- TEIXEIRA, M.A. Estudos Cinéticos Da Produção De Fermentado Simbiótico De Soja. **Dissertação para obtenção do título de mestrado em Ciência dos Alimentos**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2017.
- VASCONCELOS, C.M.; FERREIRA, CL.; PIROZI, MR.; CHAVES JBP. Análise descritiva de iogurte light suplementado com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.71, n.2, p.308-16, 2012.
- WILKIN, J.D; ASTON, I.P.; FIELDING, L.M.; TATHAM, A.S. Storage stability of whole and nibbed, conventional and high oleic peanuts (*Arachis hypogea L.*). **Food and Bioprocess Technology**, v.7, n.1, p.105-113, 2014.