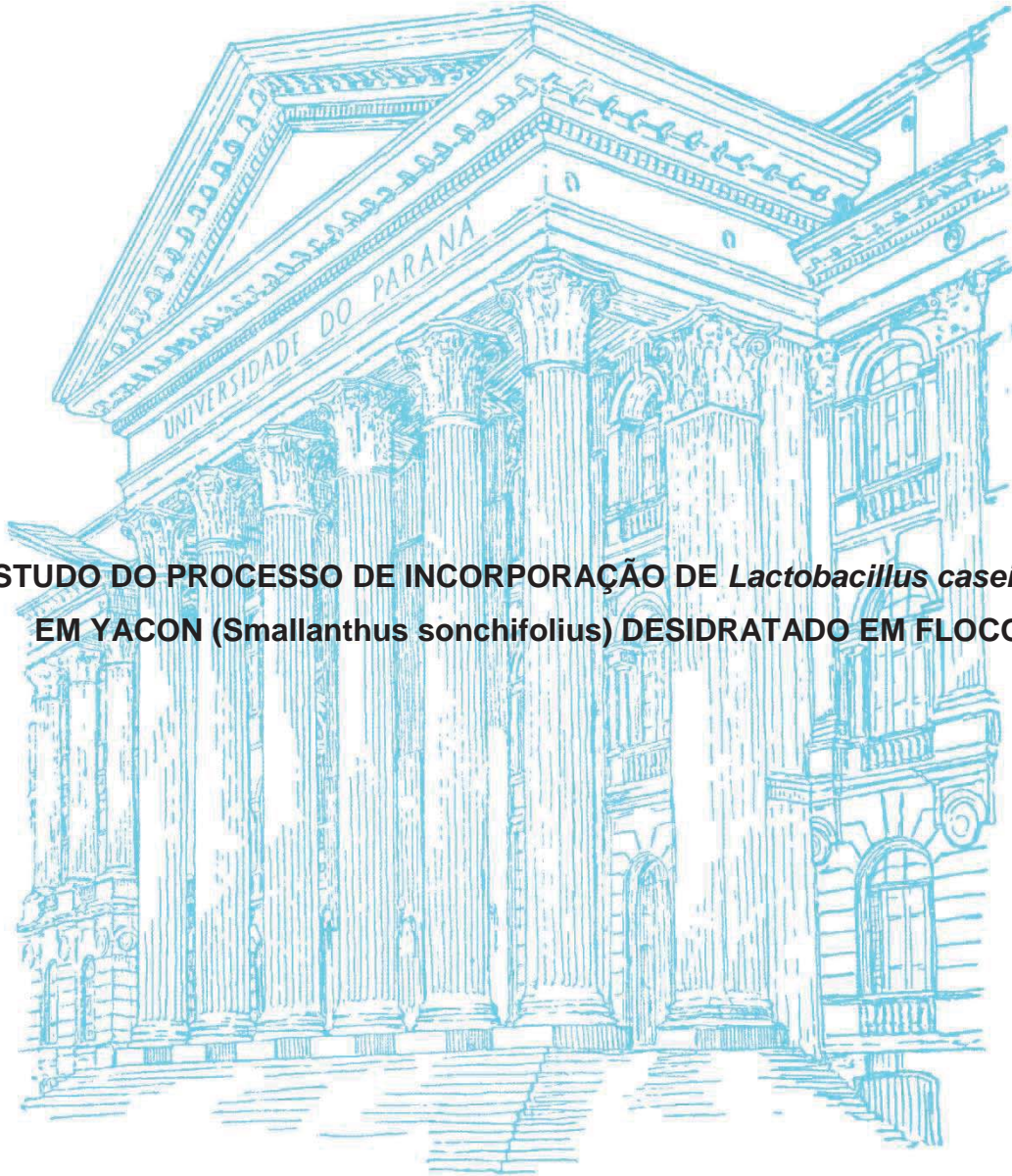


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBERTA DE SOUZA LEONE

**ESTUDO DO PROCESSO DE INCORPORAÇÃO DE *Lactobacillus casei* LC-01
EM YACON (*Smallanthus sonchifolius*) DESIDRATADO EM FLOCOS**



CURITIBA

2014

ROBERTA DE SOUZA LEONE

**ESTUDO DO PROCESSO DE INCORPORAÇÃO DE *Lactobacillus casei* LC-01
EM YACON (*Smallanthus sonchifolius*) DESIDRATADO EM FLOCOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos do Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Masson
Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Souza Neves
Ellendersen

**CURITIBA
2014**

Leone, Roberta de Souza

Estudo do processo de incorporação de *Lactobacillus casei* LC-01 em yacon (*Smallanthus sonchifolius*) desidratado em flocos / Roberta de Souza Leone. – Curitiba, 2014.

87 f. : il.; graf., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Maria Lúcia Masson

Coorientadora: Luciana Souza Neves Ellendersen

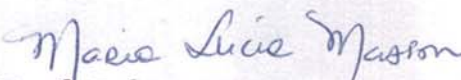
1. Yacon. 2. Alimentos -- Desidratação I. Masson, Maria Lúcia.
II. Ellendersen, Luciana Souza Neves. III. Título.

CDD 664.02842

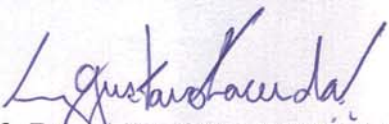
ROBERTA DE SOUZA LEONE

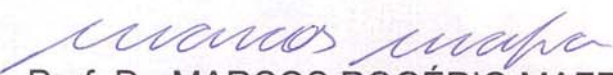
**ESTUDO DO PROCESSO DE INCORPORAÇÃO DE
Lactobacillus casei LC-01 EM YACON (*Smallanthus
sonchifolius*) DESIDRATADO EM FLOCOS**

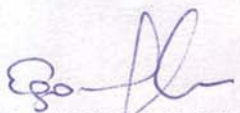
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a. Dr.^a. ALCILENE RODRIGUES MONTEIRO FRITZ
Centro Tecnológico, UFSC


Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO LACERDA
Universidade Positivo


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. EGON SCHNITZLER
Setor de Ciências Exatas e Naturais, UEPG

Curitiba, 07 de maio de 2014.

*À minha amada avó Sibila,
que me introduziu ao mundo dos livros
e nunca mediu esforços para eu chegar até aqui*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que colocou anjos ao meu redor, tornando este caminho possível, me indicando a direção e mostrando que sou amada e iluminada. Listo abaixo algumas dessas pessoas:

- Meus pais, **Eugênio** e **Emília**, exemplos de coragem. Por me mostrar que depois do esforço, sempre vem a recompensa, por ser sempre meu porto seguro, por confiarem em mim e pelo amor que sinto a cada abraço ou telefonema.
- **Fábio**, meu marido, pela parceria, carinho, por tornar tudo mais leve com um abraço, por acreditar em mim quando eu não acreditava mais e por fazer eu me sentir especial.
- **Jimi** e **Max**, por realizar meu sonho de ter um cãozinho e por mudar a energia da minha casa.
- Vó **Sibila** e tia **Clarissa**, anjos que ajudaram de todas as maneiras possíveis, com orações, um lugar para dormir, quatro ouvidos atentos, passagens de ônibus, conselhos e mimos.
- **André**, **Diogo**, **Guta**, **Adriana** e **Patrícia**, anjos da cara suja, irmãos e primas, que fazem os almoços em família muito mais divertidos.
- Prof. Dr. **Egon Schnitzler**, por ser exemplo da profissional que quero ser e, juntamente com sua equipe, **Tiago**, **Cristina** e **Marina**, pelo grande auxílio e amizade que nasceu deste trabalho. Eu nunca esquecerei o que vocês fizeram por mim. Muito obrigada.
- Minha orientadora Profa. Dra. **Maria Lúcia Masson**, por acreditar em meu potencial e por sempre me apoiar, mesmo quando discordava de minhas decisões.
- Minha Co-orientadora Dra. **Luciana S. N. Ellendersen**, por ter me incluído em seu projeto de pesquisa, acreditando que eu seria capaz de concretizá-lo.
- Prof. Dr. **Marcos Mafra**, Profa. Dra. **Luciana Mafra**, Profa. Dra. **Alcilene Fritz** e Prof. Dr. **Luiz Gustavo Lacerda**, pelas correções do meu trabalho e por contribuir com suas ideias para melhorar este documento.
- **Daniel Granato**, meu amigo, anjo pesquisador, por tornar a estatística e todo este processo mais divertidos.
- **Professores do Departamento de Engenharia de Alimentos**, da UEPG, que me receberam com apoio e ajudaram a tirar as pedras do caminho, permitindo que minha pesquisa acontecesse.

- **Amanda e Ana Maria**, anjos estagiárias, sempre dispostas, por sacrificarem alguns finais de semana comigo no laboratório, pelo carinho e por me mostrar que adoro ser professora.
- **Michele e Radla**, esclarecendo dúvidas e contribuindo com sorrisos.
- **Meus alunos da UEPG**, pela paciência com minha inexperiência, minha falta de tempo e reclamações pela falta de tempo. Vocês são especiais.
- **Denise, Vítor, Eliane, Rita, Marjori, Tamires e Aline**, pelo apoio com procedimentos de análise, orientação sobre o sistema da Universidade e pelo pãozinho na hora da fome.
- Minhas amigas, anjos presentes todos os dias, **Marina e Renata**, pelo incentivo, livros, conselhos, momentos incríveis e inesquecíveis. Amo vocês.
- Meus amigos, anjos nem sempre presentes, mas responsáveis por tornar meu caminho mais divertido: **Carol, Dayse, Mariana, Ana Mery, Ana Paula, Fabíola, André e Priscila**. O mundo é pequeno para nós, parceria sempre.
- Meu amigo **Davi**, que torce por mim, estende sua mão e tem um coração enorme do lado direito do peito.
- Meus sogros, **Iran e Lúcia**, por cuidar do Jimi e do Max todas as vezes que tivemos que nos ausentar pelos compromissos do doutorado.
- **Anjos desconhecidos**, que de forma consciente ou inconsciente, contribuíram para que eu pudesse avançar mais um passo.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A proposta deste trabalho foi estudar as condições para adicionar *Lactobacillus casei* (bactéria probiótica) no yacon desidratado, de modo que as bactérias permaneçam viáveis no alimento, por 56 dias de armazenamento, à temperatura ambiente. Para garantir que os prebióticos (inulina e FOS) não fossem degradados pelo processamento, estudou-se o comportamento térmico do yacon, utilizando as técnicas termoanalíticas calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG), cujos resultados mostraram que a temperatura de secagem não altera a estrutura molecular dos FOS e inulina em temperaturas usuais de secagem. Análises instrumentais de cor e textura auxiliaram na escolha das melhores condições do processamento de secagem do yacon, determinando a matriz seca a ser estudada junto à incorporação das bactérias probióticas. Dois tempos (1 hora e 3 horas) e presença ou ausência de trealose determinaram as variáveis dos tratamentos A, B, C e D, e com auxílio de análise estatística, as condições do tratamento A (1 hora / sem trealose), se mostraram mais adequadas à sobrevivência do maior número de bactérias durante o processamento de secagem e tempo de armazenamento. Condições gástricas foram simuladas e indicaram que, quantidade suficiente dos *Lactobacillus casei* adicionados no yacon desidratado, sobreviveram ao sistema digestivo, possuindo potencial de ação probiótica após seu consumo. As imagens no microscópio eletrônico de varredura mostraram de que forma essas bactérias se distribuem na superfície do yacon desidratado.

Palavras-chave: Yacon. *Smallanthus sonchifolius*. Fruto-oligossacarídeos. Inulina. *Lactobacillus casei*.

ABSTRACT

In this study we propose to add *Lactobacillus casei* (probiotic bacteria) to dehydrated yacon so that the bacteria remain viable in the food for 56 days of storage at room temperature. To guarantee that the prebiotics are not degraded by processing, the thermic behavior of yacon was explored using differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TG); the results showed that drying temperature does not alter the molecular structure of the FOS and inulin at usual drying temperatures. Instrument analyses of color and texture assisted in choosing better conditions for processing and drying the yacon, determining the dry matrix to be studied in incorporating the probiotic bacteria. Two time periods (1 hour and 3 hours) and the presence or absence of trehalose determined the variables of treatments A, B, C, and D, and with the assistance of statistical analysis, treatment conditions A (1 hour / no trehalose) were shown to be conducive to the survival of the largest number of bacteria during the drying process and the storage period. Gastric conditions were simulated to verify if the added *Lactobacillus casei* would have probiotic action after consumption, and scanning electron microscopy showed how these bacteria were distributed on the surface of the dehydrated yacon.

Keywords: Yacon. *Smallanthus sonchifolius*. Fructo-oligosaccharides. Inulin. *Lactobacillus casei*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ESTRUTURA QUÍMICA DA SACAROSE (GF) E FOS (GF _n e F _m).....	22
FIGURA 2-	LISTA DAS ALEGAÇÕES APROVADAS PELA ANVISA PARA FOS, INULINA E PROBIÓTICOS.....	28
FIGURA 3-	MODELO DE COR CIELAB.....	35
FIGURA 4-	CURVA TG/DTG DO CALCÁRIO.....	36
FIGURA 5-	REPRESENTAÇÃO DE CURVA DSC TÍPICA.....	37
FIGURA 6-	ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TEMPERATURAS DOS PICOS NA CURVA DSC.....	38
FIGURA 7-	ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES DIELÉTRICAS E MECÂNICAS DOS MATERIAIS APÓS A TRANSIÇÃO VÍTREA	39
FIGURA 8-	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SECAGEM DE YACON FATIADO.....	42
FIGURA 9-	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PREPARO E INCORPORAÇÃO DA BIOMASSA DE LC-01 EM YACON DESIDRATADO EM FLOCOS.....	47
FIGURA 10-	MÉDIAS DOS VALORES DE TEMPO DE RUPTURA (s), UMIDADE (%), AW E CINZAS (%) PARA YACON DESIDRATADO À 45 °C (A) E 70 °C (B).....	50
FIGURA 11-	DIFERENÇA DE COR ENTRE AS FATIAS DE YACON DESIDRATADO A 45 °C (A) E A 70 °C (B).....	52
FIGURA 12-	TG-DSC YACON SECO A 45 °C – AMOSTRA A.....	54
FIGURA 13-	TG-DSC YACON SECO A 70 °C – AMOSTRA B.....	55
FIGURA 14-	DSC YACON SECO A 45 °C – AMOSTRA A.....	57
FIGURA 15-	DSC YACON SECO A 70 °C – AMOSTRA B.....	57
FIGURA 16-	DSC YACON SECO Á 45 °C (A) e 70 °C (B) – REGIÃO DE TRANSIÇÃO VÍTREA.....	59
FIGURA 17-	DSC DO PADRÃO DE FOS.....	60
FIGURA 18-	DSC DO PADRÃO DE INULINA.....	51
FIGURA 19-	CINÉTICA DE MORTE CELULAR PARA CADA TRATAMENTO	65

FIGURA 20-	ANÁLISE DE REGRESSÃO DA QUANTIDADE DE LC-01 ADERIDOS EM RELAÇÃO AO TEMPO DE ESTOCAGEM.....	68
FIGURA 21-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS ANTES DA ADIÇÃO DE <i>L. casei</i> COM AUMENTO DE 5.000 VEZES.....	71
FIGURA 22-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE <i>L. casei</i> , NO 1º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 5.000 VEZES.....	72
FIGURA 23-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE <i>L. casei</i> , NO 14º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 5.000 VEZES.....	72
FIGURA 24-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE <i>L. casei</i> , NO 28º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 5.000 VEZES.....	73
FIGURA 25-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE <i>L. casei</i> , NO 42º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 3.500 VEZES.....	73
FIGURA 26-	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE <i>L. casei</i> , NO 56º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 2.400 VEZES.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	MÉDIAS DOS VALORES DE L^* , a^* e b^* PARA YACON DESIDRATADO À 45 °C (A) E 70 °C (B).....	51
TABELA 2-	RESULTADOS DE TG-DSC PARA AMOSTRAS A E B.....	53
TABELA 3-	RESULTADOS DE DSC PARA AMOSTRAS DE YACON DESIDRATADO A 45 °C (A) e 70 °C (B).....	56
TABELA 4-	COMPARAÇÃO ENTRE REGIÃO DE TRANSIÇÃO VÍTREA DA CURVA DSC, VALORES DE UMIDADE, A_w E TEMPO DE RUPTURA DAS AMOSTRAS A E B.....	58
TABELA 5-	RESULTADOS DE DSC PARA PADRÃO DE FOS E INULINA...	61
TABELA 6-	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE YACON DESIDRATADO A 70 °C (AMOSTRA B) EXPRESSA EM BASE ÚMIDA E SECA E RESULTADOS DE OUTROS AUTORES.....	62
TABELA 7-	MÉDIAS DE LC-01 (LOG UFC.g ⁻¹) DURANTE 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO, PARA OS QUATRO TRATAMENTOS.....	63
TABELA 8-	VARIAÇÃO DO pH ENTRE OS TRATAMENTOS EM CADA TEMPO DE ARMAZENAMENTO.....	64
TABELA 9-	MODELO DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS DE LC-01 (LOG UFC.g ⁻¹) PARA CADA TRATAMENTO DURANTE O TEMPO DE ARMAZENAMENTO E SEU AJUSTE.....	65
TABELA 10-	PORCENTAGEM MÉDIA DE SOBREVIVÊNCIA DE LC-01 ADERIDOS AO YACON ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS SIMULADAS EM SOLUÇÃO DE HCl E EM SOLUÇÃO DE SAIS BILIARES.....	68
TABELA 11-	COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE CÉLULAS DE LC-01 EM YACON DESIDRATADO ANTES E APÓS SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GÁSTRICAS, PARA CADA TEMPO DE ARMAZENAMENTO AVALIADO.....	70
TABELA 12-	EXTRAPOLAÇÃO DOS DADOS PARA SIMULAR A QUANTIDADE SOBREVIVENTE DE CÉLULAS DE LC-01 EM SITUAÇÃO DE INGESTÃO DE 30 g DE YACON DESIDRATADO COM <i>L. casei</i>	70

LISTA DE SIGLAS

ABIA	- Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação
ADA	- <i>American Dietetic Association</i>
AGCC	- Ácidos graxos de cadeia curta
ANOVA	- Análise de Variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	- Água peptonada
a_w	- Atividade de água
CTCAF	- Comissão Tecnocientífica de Acessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos
CTL	Contagem total de <i>Lactobacillus casei</i>
DSC	- Calorimetria exploratória diferencial
DTG	- Termogravimetria derivada
EFSA	- <i>European Food Safety Authority</i>
EU	- <i>European Union</i>
FAO	- <i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FOS	- Fruto-oligossacarídeos
g	- Força gravitacional
GAO	- <i>General Accounting Office</i>
GP	- Grau de polimerização
IFIC	- <i>International Food Information Council</i>
IFT	- <i>Institute of Food Technologists</i>
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia
ILSI	- <i>International Life Sciences Institute</i>
kV	- kilovolts
LC-01	- <i>Lactobacillus casei</i>
log	- Logarítmo
Mercosul	- Mercado Comum do Sul
MRS	- <i>Man-Rogosa-Sharpe</i>
OMC	- Organização Mundial do Comércio

OMS	- Organização Mundial da Saúde
PVC	- Cloreto de polivinila
RPM	- Rotações por minuto
T _F	- Temperatura final de pico
TG	- Termogravimetria
T _g	- Transição vítrea
T ₀	- Temperatura de início do pico
T _P	- Temperatura de pico
US	- <i>United States</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>
ΔH	- Variação de entalpia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>).....	18
2.2 PREBIÓTICOS	19
2.3 PROBIÓTICOS	22
2.5 SECAGEM DE YACON.....	28
2.6 MEDIÇÃO DE TEXTURA E COR EM ALIMENTOS.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 MATÉRIA-PRIMA E PROCESSO DE SECAGEM	42
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	43
3.3 PERFIL DE TEXTURA E MEDIDAS DE COR.....	43
3.4 ANÁLISES TÉRMICAS	44
3.5 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	45
3.6 OBTENÇÃO DA BIOMASSA.....	46
3.7 ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DO LC-01 EM YACON DESIDRATADO À 70 °C	46
3.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	47
3.9 SOBREVIVÊNCIA DO LC-01 ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS SIMULADAS	48
3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	49
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	50
4.2 TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS	52
4.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	62
4.4 ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE <i>Lactobacillus casei</i> EM YACON DESIDRATADO À 70 °C EM FLOCOS	63
4.5 SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS DE <i>Lactobacillus casei</i> EM CONDIÇÕES GÁSTRICAS SIMULADAS	67
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	71

5 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os estudos atuais sobre yacon (*Smallanthus sonchifolius*) têm mostrado diversos benefícios advindos do consumo dessa raiz. Natural da região andina, atualmente está distribuído pelo mundo todo e tem sido consumido na forma “*in natura*” por pessoas diabéticas, com a intenção de obter auxílio no controle da glicemia sérica. Rico em água (cerca de 90 %) sua vida útil é muito curta e técnicas de secagem têm sido aplicadas para aumentar sua durabilidade e facilidade de distribuição.

O processo de desidratação consiste na retirada da água contida nos alimentos que está disponível às reações químicas e enzimáticas e às atividades microbianas, estendendo assim, a vida útil do produto. Diversos métodos de secagem podem ser aplicados e escolha desse método é determinada em função das propriedades do alimento e, principalmente, viabilidade econômica. Através de diferentes métodos e condições de secagem é possível obter produtos com diferentes propriedades, incluindo tamanho, forma e cor das partículas, capacidade de sorção de água, estabilidade química, solubilidade em água, higroscopicidade, propriedades de escoamento, etc.

Excluindo a água, o yacon é rico em carboidratos e fibra alimentar. As fibras do yacon são compostas, principalmente, de inulina e fruto-oligossacarídeos (FOS) e, a estas duas substâncias, é atribuída a funcionalidade da raiz. A inulina costuma ser despolimerizada em FOS e ambos têm função prebiótica. Prebióticos são ingredientes alimentícios não digeríveis que possuem efeito benéfico após sua ingestão, devido ao estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de espécies bacterianas já presentes no intestino grosso.

As bactérias que sobrevivem ao sistema digestório e conseguem colonizar o intestino grosso do hospedeiro, causando benefícios a sua saúde, são classificadas como probióticas. Bactérias do gênero *Lactobacillus* spp são fermentadoras dos oligossacarídeos e estão, principalmente, relacionados à proteção contra agentes infecciosos pela diminuição da colonização intestinal por patógenos e regulação do funcionamento do intestino.

Desta forma, quando relacionamos em um só alimento bactérias probióticas e o substrato necessário para sua colonização eficiente no cólon, temos melhora da

sua funcionalidade, já que há sinergismo entre a ingestão conjunta de prebióticos e probióticos.

O yacon desidratado possui diversas vantagens, como menor volume e maior durabilidade, além da concentração dos seus componentes de interesse funcional. Como a maioria dos alimentos que contém probióticos, e que está disponível ao consumidor, necessita ser armazenado sob temperatura de refrigeração (p.e. leites fermentados, iogurtes e bebidas lácteas), desenvolver um processo que mantenha a viabilidade dessas bactérias em um produto que pode ser armazenado à temperatura ambiente é muito interessante.

Com o objetivo principal de estudar uma forma de incorporar *Lactobacillus casei* (LC-01) em yacon desidratado, foi proposto avaliar a viabilidade destas bactérias durante 56 dias de armazenamento, por representar o dobro do tempo de vida-de-prateleira normalmente recomendado para produtos lácteos probióticos. Técnicas termoanalíticas, como Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG), permitiram avaliar, entre outras coisas, se a temperatura de secagem do yacon seria capaz de degradar a inulina e os FOS, componentes importantes no produto final. Condições gástricas foram simuladas para permitir classificar o alimento como probiótico e a aplicação microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou a aderência das células de LC-01 na superfície do yacon desidratado em flocos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o processo de incorporação e a viabilidade do *Lactobacillus casei* (LC-01) em yacon desidratado por processo convectivo e armazenado por 56 dias.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o yacon seco em estufa convectiva, nas temperaturas de 45 °C e 70 °C, quanto aos parâmetros físico-químicos de cor, textura, umidade e a_w ;
- Verificar se existe relação entre transição vítrea com textura, umidade e atividade de água no yacon desidratado;
- Identificar fenômenos térmicos no yacon desidratado por técnicas termoanalíticas, como calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria;
- Confirmar por TG, se a maior temperatura de secagem, utilizada neste estudo, é inferior à temperatura de início das reações de degradação dos prebióticos (FOS e inulina), naturalmente presentes no yacon;
- Confirmar a hipótese de que a trealose tenha função protetora sobre as células de LC-01 durante o processo de incorporação dos probióticos no yacon;
- Determinar as condições de processamento favoráveis de incorporação de LC-01 no yacon desidratado em flocos;
- Quantificar a sobrevivência de LC-01 aderidos ao yacon em condições gástricas simuladas e verificar se o produto final do processo se encaixa na classificação de alimento probiótico;
- Verificar a presença de LC-01 aderidos à superfície do yacon por microscopia eletrônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

O yacon, é uma planta perene que pertence à família do girassol (*Compositae* sp. ou *Asteraceae* sp.). Ela é nativa da região dos Andes, principalmente do Peru e Colômbia, de onde se espalhou para Nova Zelândia, Brasil, EUA, Rússia e Europa. Inicialmente foi classificada como pertencente ao gênero *Polymnia* sp. Porém, em 1978, uma perspectiva diferente foi adotada propondo a denominação *Smallanthus*, que englobou todas as espécies sul-americanas e da América central. A maioria das espécies norte-americanas permaneceram no gênero *Polymnia*. (SANTANA e CARDOSO, 2008).

A planta produz raízes de aspecto semelhante à batata doce, pesando cerca de 200-500 g, com sabor adocicado e polpa crocante. É uma raiz que possui inulina (3-10%) e fruto-oligossacarídeo (FOS) como carboidratos de reserva. Esses oligossacarídeos pertencem ao grupo dos carboidratos não digeríveis, pois a ligação glicosídica que une as unidades de frutose, para formar a molécula, possui a configuração β (2 \rightarrow 1), que as enzimas digestivas humanas não são capazes de hidrolisar (ROBERFROID e SLAVIN, 2000; LACHMAN *et al.*, 2003; VILLEGAS e COSTELL, 2007; DELGADO *et al.*, 2013).

Estudos atuais destacam que o efeito protetor, da raiz e das folhas de yacon, contra o desenvolvimento de diabetes está relacionado à esses carboidratos (HONORÉ *et al.*, 2012; HABIB *et al.*, 2011). Muitos autores concordam que essas substâncias são os principais responsáveis por alguns benefícios fisiológicos ao consumidor como: melhora de problemas digestivos, promoção da resposta imune, aumento da resistência a infecção por patógenos e redução de alergias digestivas (CAMPOS *et al.*, 2012).

Além destes componentes, a literatura reporta que a raiz de yacon contém compostos fenólicos (antioxidantes), alguns carboidratos como frutose, glicose e sacarose, alto conteúdo de água e valor energético reduzido (GENTA *et al.*, 2009; VALENTOVÁ *et al.*, 2006).

A quantidade de FOS encontrada na raiz de yacon é maior que em muitas outras plantas, onde a presença deste carboidrato é comum (GENTA *et al.*, 2009). Juntamente com a inulina, o FOS é um polissacarídeo natural, composto de uma mistura de oligômeros com variável número de unidades de frutose (grau de polimerização de 2 a 60 unidades) podendo ter, ou não, uma molécula de glicose terminal (FLAMM, *et al.*, 2001; VILLEGAS e COSTELL, 2007).

Estes carboidratos possuem função prebiótica por promoverem o crescimento de bactérias probióticas no colon. As bactérias dos gêneros *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* são as que mais utilizam os oligossacarídeos, sendo consideradas capazes de trazer benefício à saúde do hospedeiro (BIELECKA *et al.*, 2002). Em geral, o consumo de yacon promove o crescimento destas bactérias (CAMPOS *et al.*, 2012), permitindo-as colonizarem o cólon e estimular o bom funcionamento do intestino.

A ingestão de yacon pode ter potencial como um agente quimiopreventivo contra desenvolvimento de tumores no cólon. Esse efeito está associado ao ácidos graxos de cadeia curta produzidos durante a fermentação de FOS e inulina pela microbiota intestinal (KLINDER *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2012).

As aplicações industriais de prebióticos, em conjunto com probióticos, na formulação de alimentos, aumentou nos últimos anos, porém, um estudo com consumidores concluiu que é preciso colocar no mercado mais alimentos adicionados de probióticos e que a indústria de alimentos deve investir na divulgação dos benefícios à saúde do consumidor, para estimular a compra e o consumo maior destes produtos (PIMENTEL, 2012; MUSSATTO e MANCHILHA, 2007).

Em geral, prebióticos e probióticos consumidos em um mesmo alimento possuem efeito sinérgico positivo quando se compara com a ingestão de prebióticos ou probióticos isoladamente (KLINDER *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2012).

2.2 PREBIÓTICOS

GIBSON e ROBERFROID (1995) definiram prebióticos pela primeira vez, definição esta que foi atualizada por GIBSON, *et al.* (2004), sendo assim, um prebiótico é um ingrediente seletivamente fermentado que permite mudanças

específicas, tanto na composição quanto na atividade da microflora gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde e ao bem-estar do hospedeiro.

Em geral, os prebióticos permitem uma modificação benéfica da composição da microflora do hospedeiro. O conceito de prebióticos implica que devem ser estáveis no estômago, isto é, não sofrer influência do suco gástrico, e não devem ser absorvidos no intestino delgado e, portanto, ser capaz de chegar ao cólon, onde serão fermentados seletivamente pelas bactérias específicas que exercem efeito benéfico ao hospedeiro (ROBERFROID, 2002 e GIBSON *et al.*, 2004).

Todos os prebióticos, com exceção da inulina, são carboidratos de cadeia curta com baixo grau de polimerização (GP), e muitas vezes referidos como oligossacarídeos (MANNING e GIBSON, 2004). Os oligossacarídeos são carboidratos de cadeia curta compostos de 3-10 unidades de monossacarídeos. A composição, a ligação glicosídica e o GP são importantes para influenciar as propriedades prebióticas (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; SANZ, *et al.*, 2006)

Os oligossacarídeos mais comumente investigados para a atividade prebiótica são fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS), porém as características prebióticas também são encontradas em lactulose, oligossacarídeos de soja, lactossacarose, isomalto oligossacarídeos (IMO), xilo-oligossacarídeos (XOS), e palatinose (GIBSON, OTTAWAY e RASTALL, 2000). Outro importante prebiótico é o polissacarídeo inulina, composto, em média, por 12 a 15 unidades de frutose, número esse que pode chegar a 65 (MACFARLANE *et al.*, 2006). Juntos, os fruto-oligossacarídeos e a inulina, são agora considerados os prebióticos modelos (ROBERFROID, 2008).

ROBERFROID (2002) concluiu que o consumo de 5-15 g/dia de FOS ou inulina, por algumas semanas, mostraram evidências de atividade prebiótica. Estes dois polímeros diferem entre si, principalmente, pelo seu grau de polimerização. A FIGURA 1 mostra a estrutura química de FOS e inulina.

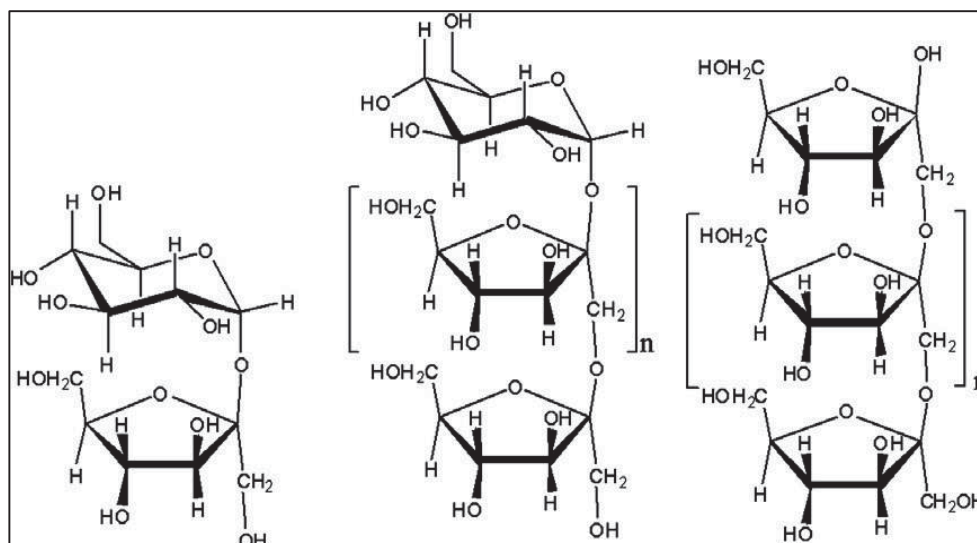


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SACAROSE (GF) E FOS (GF_n e F_m)
 G = GLICOSE; F = FRUTOSE; FOS (n = 3-10); INULINA (n_{médio} = 11-15, até GP=63)
 Fonte: MORRIS e MORRIS (2007)

A diferença de estrutura entre a inulina e FOS tem impacto importante sobre a sua funcionalidade. A inulina é capaz de formar géis e não é considerada doce, por essa razão, tem sido utilizada com sucesso como substituto de gordura (WOUTERS, 2010). Os FOS são mais solúveis em sistemas aquosos, possuem sabor doce (cerca de 30 % da doçura da sacarose) e são adicionados, principalmente, como substitutos de açúcar e por suas propriedades prebióticas (COUSSEMENT, 1999; NINESS, 1999). Em ambos os casos, eles fornecem baixo teor de calorias (1,5 kcal.g⁻¹) (ROBERFROID, 1999).

Efeito da suplementação de FOS ou inulina na manutenção do peso corporal e na saciedade foi estudada por MORRIS e MORRIS (2007). A pesquisa mostrou que esses prebióticos podem ajudar uma determinada categoria de pessoas a controlar ativamente o seu peso, porém, o mecanismo fisiológico que liga os prebióticos com a perda de peso precisa ser melhor estudado.

Efeitos protetores do desenvolvimento de câncer no cólon foram estudados por MOURA, *et al.*, (2012) e TARAPORE *et al.*, (2012) que sugerem que a ingestão de raiz yacon pode reduzir o risco de desenvolvimento desta doença, quando induzida quimicamente, atribuindo este efeito aos 20,4% de FOS presente no xarope de yacon em pó utilizado na alimentação dos ratos avaliados no experimento.

Xaropes adoçantes com adição de FOS foram indicados para pessoas que sofrem de problemas digestivos (CHARALAMPOPOULOS e RASTALL, 2012). O tratamento oral com xarope de yacon acelerou nitidamente o tempo de trânsito

colônico em indivíduos saudáveis (GEYER *et al.*, 2008) e aumentou a frequência de defecação e sensação de saciedade em obesos e em mulheres em pré-menopausa com dislipidemia (GENTA *et al.*, 2009).

2.3 PROBIÓTICOS

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO / WHO, 2001). Bactérias lácticas (BAL), especialmente *Lactobacillus* spp., e *Bifidobacterium* spp. são os micro-organismos probióticos mais vulgarmente utilizados. Muitas de suas cepas estão incluídas no grupo GRAS, "Geralmente Reconhecido como Seguro", do FDA – Food and Drug Administration, órgão regulador de alimentos e medicamentos dos EUA (MATTIA e MERKER, 2008) e são geralmente considerados seguros pelo consumidor.

O regulamento para produtos probióticos é muito rigoroso, com permissão restrita nas alegações, de propriedades funcionais e/ou de saúde, na rotulagem. A EFSA (European Food Safety Authority) exige uma abordagem específica sobre a eficácia, que ainda está fora do alcance para a maioria dos fabricantes, uma vez que não existem marcadores biológicos e os ensaios clínicos de grande dimensão são muito caros (STRINGHETA, *et al.*, 2007). No Brasil, a comprovação da eficácia da alegação deve ser realizada caso a caso, considerando a formulação e as características do alimento. A aprovação da alegação faz parte de um processo contínuo e dinâmico de reavaliação das alegações aprovadas com base em evidências científicas (BRASIL, 2014).

A importância do papel da microbiota intestinal na manutenção da saúde e prevenção de doenças é bastante reconhecida. Distúrbios desse delicado equilíbrio podem gerar outras desordens e facilitar o estabelecimento de doenças. Segundo HOLZAPFEL e SCHILLINGER (2002), esses fatos explicam os grandes desafios com respeito à apresentação de evidências científicas que confirmem os reais efeitos funcionais relacionados aos microrganismos probióticos.

A fim de promover potencialmente um efeito para a saúde, a ingestão oral de um probiótico terá de satisfazer um limiar pré-estabelecido de células viáveis. O

consumo de 100 g do alimento contendo entre 10^6 e 10^8 UFC.g⁻¹ (6 e 8 log UFC.g⁻¹) de produto, no tempo de consumo, é geralmente aceito como sendo suficiente para a colonização bem sucedida e adequada do trato gastrointestinal (FAO / WHO, 2001; ISHIBASHI e SHIMAMURA, 1993). Outros trabalhos propuseram como dose mínima diária de culturas probióticas, para ter ação terapêutica, 8 a 9 log UFC.100g⁻¹ (TALWALKAR e KAILASAPATHY, 2004). A ANVISA exige 8 a 9 log UFC.g⁻¹ na porção diária recomendada do alimento (BRASIL, 2014). Isto implica que um número suficiente de células probióticas devem estar presente no produto final, depois de todos os passos de fabrico. Além disso, a viabilidade das células deve ser mantida durante todo o período de vida útil do produto, o que seria dependente das propriedades físico-químicas da matriz alimentar e da forma como o alimento é armazenado e transportado. Finalmente, após o consumo, determinada quantidade de células devem sobreviver a passagem pelo sistema digestório, e, por consequência, tolerar a acidez do estômago, toxicidade de sais biliares e resistir à atividade enzimática, sendo capazes de colonizar o intestino grosso e de promover os seus efeitos benéficos (LEE e HEO, 2000, BRASIL, 2014).

O consumo regular de alimentos probióticos está sendo relacionado com diversos benefícios à saúde, como redução do risco de câncer, influenciando características imunomoduladoras e prevenindo alergias alimentares (ISOLAURI *et al.*, 2001; JAHREIS *et al.*, 2002); combatendo a hipercolesterolemia (SAARELA *et al.*, 2002); alívio aos sintomas de intolerância à lactose (SALMINEN *et al.*, 1998); capacidade de inibir patógenos (CROSS, 2002; DRAGO *et al.*, 1997) e de proteger os seres humanos de doenças gastrointestinais (MARTEAU *et al.*, 2001).

Diferentes parâmetros devem ser abordados ao selecionar cepas probióticas. Estes incluem a segurança, a produção tecnológica e a eficácia ou funcionalidade (FAO / WHO, 2001). Para promover a eficácia após o consumo, existem algumas propriedades que influenciam diretamente a manutenção da viabilidade celular durante as etapas do processo e o tempo de armazenamento. Estirpes selecionadas, devem apresentar robustez celular elevada, bem como, contagem inicial de células alta, como evidencia GOMES e MALCATA (1999). A produção de alimentos funcionais com cepas probióticas exige avaliações de segurança extensivas e indicam a segurança de estirpes de *Lactobacillus* spp. e nenhuma toxicidade para concentrações tão elevadas como 10^{12} UFC.g⁻¹ no produto, o que os torna adequados para a incorporação nos alimentos.

De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2014), os microrganismos que podem ser classificados como probióticos para alimentação humana são: *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Eterococcus faecium*.

Os *Lactobacillus casei* foram capazes de fermentar FOS de yacon sob condições anaeróbias (BURITI e SAAD, 2007). Os fruto-oligossacarídeos são completamente fermentados no intestino grosso (ALLES *et al.*, 1996), e o tipo de bactéria influencia na eficiência do prebiótico (RYCROFT, *et al.*, 2001). Os últimos estudos demonstram que há sinergismo entre prebiótico e probiótico, potencializando seus benefícios quando administrados juntos (KOH, *et al.*, 2013).

2.3.1 *Lactobacillus casei*

Bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. caracterizam-se como gram-positivas, em forma de haste e não formadora de esporos. Podem ser isoladas a partir de amostras de alimentos, através da utilização de meios de cultura complexos, tais como MRS (Man-Rogosa-Sharpe) ou MRS adicionado com agentes seletivos específicos.

As bactérias do grupo *Lactobacillus casei* têm sido amplamente estudadas com relação a suas propriedades promotoras à saúde. Várias funções benéficas ao organismo humano têm sido atribuídas ao consumo regular de alimentos contendo bactérias desse grupo. As espécies de *Lactobacillus casei* constituem uma fração substancial da microbiota constituída por *Lactobacillus* spp. na mucosa intestinal humana e os efeitos atribuídos a esses microrganismos estão principalmente relacionados à proteção contra agentes infecciosos pela diminuição da colonização intestinal por patógenos (CANO e PERDIGÓN, 2003), ativação das imunidades local e sistêmica (MEDICI *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2002), redução dos sinais clínicos de diarreia por rotavírus (GUÉRIN-DANAN *et al.*, 2001), diminuição dos níveis de triglicérides séricos e de colesterol (HABIB *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de produtos lácteos contendo bactérias probióticas é um foco importante das indústrias de alimentos e, geralmente, a produção de alimentos contendo cepas probióticas específicas com concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida de prateleira é um desafio tecnológico (MEDICI et al., 2004; KOURKOUTAS, 2005). O crescimento ótimo dessas bactérias se dá na faixa que compreende entre 35 e 40°C e pH 5,5 a 6,0. Diversas espécies de *Lactobacillus* sp. são oficialmente reconhecidas e *L. casei* estão entre as três mais utilizadas para fins de aditivo dietético, junto com *Lactobacillus acidophilus* e *L. rhamnosus* (PIMENTEL et al., 2005; BERNARDEAU et al., 2007).

A aderência de microrganismos probióticos às células epiteliais do intestino e a subsequente colonização da mucosa são de fundamental importância para a ocorrência dos efeitos benéficos à saúde humana (FORESTIER et al., 2001; HUDAULT et al., 1997). Dentre as várias características associadas às bactérias lácticas, particularmente ao grupo *Lactobacillus casei*, destaca-se, o fato delas possuírem atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, contaminantes e deteriorantes, em alimentos e no intestino humano (SCHWENNINGER et al., 2005; CALDERÓN et al., 2007; COEURET et al., 2004).

2.4 REGULAMENTAÇÃO DE ALIMENTOS PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS

O conceito de alimentos funcionais vem mudando ao longo dos anos, devido aos crescentes estudos científicos nesta área e, desenvolvimento de uma ampla gama de produtos (SIRO et al., 2008). O termo "alimentos funcionais" foi introduzido pela primeira vez na década de 1980, como resultado de uma série de programas de pesquisa financiados pelo governo japonês em análise sistemática e desenvolvimento das funções dos alimentos (ROBERFROID, 2000). Todavia, mesmo diante do progressivo aumento da popularidade dos alimentos funcionais, não existe uma definição universal. A agência americana FDA (*Food and Drug Administration*) não possui uma definição legal para o termo, enquanto que a ADA (*American Dietetic Association*), o IFIC (*International Food Information Council*) e o IFT (*Institute of Food Technologists*) não entraram em consenso (BALDISSERA et al., 2011). A *US General*

Accounting Office - GAO definiu alimentos funcionais como alimentos que alegam ter benefícios além da nutrição básica (MORAES e COLLA, 2006).

A OMS aprovou em 2004 a Estratégia Global para Dieta, Atividade Física e Saúde e a ANVISA, seguindo as recomendações do *Codex Alimentarius*, criou em 2005, o Guia Alimentar para a População Brasileira que trata, dentre outras coisas, da prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis, já que as evidências científicas apontam o impacto da alimentação saudável na prevenção das mortes prematuras causadas pelas doenças cardíacas e pelo câncer.

Assim, este guia tem o propósito de contribuir para a orientação de práticas alimentares que visem à promoção da saúde e à prevenção de doenças relacionadas à alimentação (WHO, 2008; BRASIL, 2005). O guia traz diretrizes de rotulagem e determina que os rótulos dos alimentos podem trazer alegações de propriedade funcional e, ou de saúde, desde que previamente aprovadas pela ANVISA.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é a agência reguladora brasileira, que concede registros de produtos, dentre outras inúmeras atribuições, e é vinculada ao Ministério da Saúde (STRINGHETA, *et al.*, 2007). A alegação de propriedade funcional aprovada pela CTCFAF (Comissão Tecnocientífica de Acessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos) da ANVISA para FOS, inulina e algumas variedades de *Lactobacillus casei*, estão na FIGURA 2.

Todos os órgãos e comissões anteriormente citados, têm o objetivo de proteger o consumidor de falsas informações e propaganda enganosa. A ANVISA é responsável pela aprovação dos alimentos funcionais produzidos e comercializados no Brasil, e interage com os órgãos reguladores dos países que fazem parte da Organização Mundial da Saúde.

Os estudos com *Lactobacillus* spp. indicam que eles possuem outras funções benéficas (CANO e PERDIGÓN, 2003; MEDICI *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2002; GUÉRIN-DANAN *et al.*, 2001), além da manutenção da microbiota intestinal, porém nenhuma delas foi aprovada pela ANVISA para ser alegada no rótulo dos alimentos consumidos no Brasil. São exemplos: “aumenta os anticorpos”; “reforçam as defesas naturais do organismo contra as agressões do dia a dia, como estresse e cansaço”; “promovem a saúde do trato digestivo”. Porém, dizer que “auxilia na manutenção do balanceamento da microbiota e no equilíbrio do intestino”; “auxilia na redução das bactérias nocivas” e “auxilia no aumento da flora benéfica” é permitido (LAJOLO, 2002).

<p>FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO</p> <p>Alegação</p> <p>“Os Fruto-oligossacarídeos – FOS contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e a hábitos de vida saudáveis”.</p> <p>Requisitos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de FOS se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido. • No caso de produtos nas formas de cápsulas, tabletes, comprimidos e similares, os requisitos acima devem ser atendidos na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. • Na tabela de informação nutricional deve ser declarada a quantidade de frutooligossacarídeo, abaixo de fibras alimentares. • O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante. • Quando apresentada isolada em cápsulas, tabletes, comprimidos, pós e similares, a seguinte informação, em destaque e em negrito, deve constar no rótulo do produto: “O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos”.
<p>INULINA</p> <p>Alegação</p> <p>“A inulina contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e a hábitos de vida saudáveis”.</p> <p>Requisitos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de FOS se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido. • No caso de produtos nas formas de cápsulas, tabletes, comprimidos e similares, os requisitos acima devem ser atendidos na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. • Na tabela de informação nutricional deve ser declarada a quantidade de frutooligossacarídeo, abaixo de fibras alimentares. • O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante. • Quando apresentada isolada em cápsulas, tabletes, comprimidos, pós e similares, a seguinte informação, em destaque e em negrito, deve constar no rótulo do produto: “O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos”.
<p>PROBIÓTICOS</p> <p><i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus casei shirota</i> <i>Lactobacillus casei variedade rhamnosus</i> <i>Lactobacillus casei variedade defensis</i></p> <p>Requisitos Específicos</p> <p>“O (indicar o micro-organismo probiótico) contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e a hábitos de vida saudáveis”.</p> <p>Observações</p> <ul style="list-style-type: none"> • A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10⁸ a 10⁹ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. • A documentação referente à comprovação de eficácia, deve incluir: <ul style="list-style-type: none"> • Laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade. • Teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares. • A quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação.

FIGURA 2 – LISTA DAS ALEGAÇÕES APROVADAS PELA ANVISA PARA FOS, INULINA E PROBIÓTICOS
Fonte: adaptado de BRASIL (2014)

2.5 SECAGEM DE YACON

Durante o descascamento do yacon, quando as membranas das células são rompidas, os polifenóis e os taninos misturam-se às enzimas citoplasmáticas, causando a oxidação enzimática e tornando a epiderme escura. Esta oxidação se dá em presença de oxigênio livre, prejudicando a aparência do yacon e a de seus produtos (VALENTOVÁ e ULRICHOVÁ, 2003). A ação de escurecimento enzimático é reduzida com a secagem do yacon, porém o tempo de secagem é longo demais para que possa evitar a ação das enzimas e, deste modo, a exposição ao ar da superfície recém-cortada das raízes deve ser minimizada antes do processamento.

Além da degradação enzimática, também ocorrem mudanças na composição dos carboidratos do yacon. Segundo GRAEFEA *et al.* (2004), os FOS tendem a se despolimerizar em sacarose e açúcares redutores, como glicose e frutose, muito rapidamente após a colheita, sobretudo quando o produto é mantido fora de refrigeração, sendo a taxa de reação de despolimerização acelerada com o tempo e com o aumento da temperatura de armazenagem. O controle das reações de despolimerização dos FOS, pode ser realizado por meio da redução do teor de umidade do yacon, do armazenamento em baixas temperaturas, da eliminação do oxigênio do meio ou minimização da exposição do yacon descascado ao ar ambiente, e da utilização de agentes químicos antioxidantes (PERUSSELLO *et al.*, 2013).

A forma mais utilizada para aumentar a durabilidade da raiz de yacon é a transformação em produto desidratado, em pó ou não. No caso do yacon, os principais fatores limitantes para o uso de temperaturas elevadas são a despolimerização dos FOS, resultando em perda de valor nutricional, o escurecimento não-enzimático proveniente da reação de caramelização, e o aumento da intensidade do pigmento formado durante a possível degradação enzimática no pré-processamento. Segundo ARAÚJO (2004), a temperatura afeta a composição do pigmento formado, aumentando o teor de carbono, e, portanto, a sua intensidade. Assim, é necessário usar temperaturas amenas durante o processo de secagem, de até 80°C.

Em todos os processos de secagem, as propriedades físicas e químicas do material que se deseja desidratar são fatores importantes a serem considerados, devido às mudanças que podem ocorrer e os efeitos dessas mudanças na eliminação da água contida no alimento, incluindo tamanho, forma e cor das partículas,

capacidade de sorção de água, estabilidade química, solubilidade em água, higroscopicidade, encolhimento, etc. A diminuição de volume, pode ser uma vantagem, pois implica na redução de custos com transporte, embalagem e estocagem dos produtos obtidos. Porém, a água confere ao alimento características desejáveis de textura, como palatabilidade e suculência (CELESTINO, 2010) e a perda dessas características pode ser indesejável.

2.5.1 Estudos de Secagem de Yacon

As características de qualidade de yacon desidratado a diferentes temperaturas (5, 15, 25, 35 e 45 °C) e velocidades do ar de secagem (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 m/s) foram investigados por SHI, ZHENG e ZHAO (2013). Os resultados indicaram que a temperatura de secagem e a velocidade do ar tiveram efeito significativo sobre o comportamento de secagem de fatias yacon e que o processo ocorreu no período de taxa decrescente. O tempo de secagem diminuiu com o aumento da temperatura de secagem e da velocidade do ar, porém esses parâmetros não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre a diferença de cor, taxa de encolhimento e taxa de reidratação das fatias de yacon secas.

MOURA (2004), estudou a secagem osmo-convectiva de fatias de yacon. Dentre as diferentes condições de processo testadas, foi observado que a desidratação osmótica deve ser conduzida a 30°C, a espessura das fatias deve ser 2 mm e a solução desidratante (água + sorbitol) deve apresentar concentração de 50 ° Brix. Sob estas condições de processo concluiu-se que nessas condições houve a maior retirada de água e a menor perda de sólidos do produto. O pré-tratamento osmótico diminuiu o tempo de secagem convectiva e resultou em maior perda de água ao final. As melhores condições de secagem convectiva foram na temperatura de 70° C, espessura de 2 mm e concentração de sólidos no pré- tratamento osmótico de 35 a 50° Brix.

No intuito de diminuir ou evitar a atividade enzimática no yacon, tratamentos com agentes químicos ou como o branqueamento têm sido usados previamente à secagem convectiva. Em estudo realizado por SCHER, RIOS e NOREÑA (2009), foi avaliado o comportamento de secagem do yacon com e sem branqueamento a vapor.

A secagem utilizou as temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C e teve duração de 5,5 horas. A maior temperatura proporcionou o menor tempo de secagem, e menores valores de atividade de água foram atingidos por amostras tratadas com branqueamento, em todas as temperaturas de secagem utilizadas. Além disso, o yacon sem branqueamento mostrou concentrações mais baixas de açúcares redutores quando desidratado a 70°C, em comparação com as amostras secas às temperaturas mais baixas, o que indica hidrólise dos FOS a 70°C.

PADILHA *et al.* (2009) avaliaram o emprego dos agentes químicos cloreto de cálcio e metabissulfito de potássio no processamento de yacon, para obtenção de farinha, a fim de inibir o escurecimento enzimático do produto e favorecer o tempo de secagem. As amostras foram secas a 55°C em estufa ventilada. Apesar de não inibir totalmente a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, o experimento que utilizou o metabissulfito propiciou menor tempo de secagem e melhor firmeza da matéria-prima.

PERUSSELLO *et al.* (2013) estudaram a secagem osmo-convectiva de fatias de yacon. Testou-se a influência de dois níveis de agitação (0 cm/s e 4 cm/s) e de temperatura (30 °C e 50 °C) para a desidratação osmótica, e de dois níveis de temperatura (60 °C e 80 °C) para a etapa de secagem convectiva nos seguintes parâmetros de qualidade do produto final: conteúdo de umidade, concentração de sólidos solúveis, luminosidade e mudança de cor. Os autores concluíram que, a secagem osmo-convectiva produziu fatias de yacon com baixa atividade de água e que a aplicação do tratamento osmótico reduziu os graus de escurecimento e de encolhimento e os danos estruturais, tais como distorção angular e aparecimento de fissuras, das fatias submetidas à secagem convectiva.

KOTOVICZ *et al.* (2013) otimizaram a secagem osmo-convectiva do yacon em função da perda de água, da incorporação de sólidos, do tempo de secagem e da atividade de água do produto final. As condições ótimas de desidratação osmótica foram: utilização de revestimento de alginato de sódio, concentração da solução osmótica (água + frutose) de 68 °Brix e temperatura de 30 °C. O uso destas condições de processo levou à maior perda de água e menor incorporação de sólidos. Na secagem convectiva, os autores concluíram que quanto maior a temperatura empregada, menor foi o tempo de secagem observado e mais rápida foi a diminuição da atividade de água.

Com objetivo de avaliar o efeito de diferentes condições de processo de secagem à vácuo sobre parâmetros de qualidade de fatias de yacon, REIS, LENZI e MASSON (2012) concluíram que: com o avanço da secagem, a cor do yacon em fatias tornou-se mais escura, mais vermelha e mais amarela; a textura das fatias variou pouco nos instantes iniciais de secagem, seguida de amaciamento (diminuição da dureza) em instantes intermediários e endurecimento (aumento da dureza) nos instantes finais; e altas temperaturas (58 - 65 °C), baixas espessuras ($\leq 0,4$ cm) e altas concentrações de ácido ascórbico (0,8 - 1,0 g/100 g) deram origem a produtos de cor pouco escurecida (altos valores de L^*) e amarela dourada (altos valores de b^*).

Os fruto-oligosacarídeos (FOS) podem ser utilizados como ingredientes alimentares, pelas suas propriedades prebióticas ou pelas propriedades tecnológicas interessantes, como um substituto do açúcar. Com a proposta de estudar as características físico-químicas de um possível ingrediente alimentar rico em FOS, ALLES, TESSARO e NOREÑA (2014) liofilizaram extrato de raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) produzido por tecnologia de membrana e estudaram características de cor, atividade de água (a_w) e microestrutura do pó. O produto obtido, composto por 19,75 % de FOS, 36,66% de glicose e 43,59 % de frutose (p/p) foi um pó granulado esbranquiçado, coordenadas de cor CIELAB, L^* , a^* e b^* de $76,25 \pm 1,19$, $-1,03 \pm 0,09$ e $1,02 \pm 0,03$, respectivamente, e com a_w de 0,284. Foi altamente higroscópico e com tendência de aglomeração, confirmada pela análise de microscopia eletrônica de varredura.

Foram estudadas as propriedades termodinâmicas e as mudanças no volume de yacon durante sua secagem convectiva. Os resultados indicaram altas taxas de perda de umidade e redução de atividade de água durante os primeiros 150 min de secagem. Encolhimento do produto ficou evidente, com uma redução de cerca de 89 % do volume, observado por varredura a laser tridimensional e pelas mudanças estruturais observadas durante microscopia eletrônica de varredura, indicando retração tecidual grave e colapso durante a secagem (BERNSTEIN e NOREÑA, 2014).

2.5.2 Umidade, Atividade de Água e Micro-organismos

O conteúdo de água de um alimento é expresso por um valor obtido por técnicas analíticas. O valor medido é a umidade do alimento, portanto, o restante dos componentes são denominados sólidos totais. A umidade não é suficiente para prever a estabilidade do alimento, sendo a atividade de água (a_w) mais adequada para tal função (CELESTINO, 2010). Alimentos classificados como secos, desidratados ou de baixa umidade são aqueles que não possuem mais que 25 % de umidade e atividade de água (a_w) entre 0,00 e 0,60 (JAY, 2005).

A atividade de água é a quantidade de água, sem a qual os micro-organismos (MO) não conseguem se desenvolver. Por definição é a razão entre a pressão de vapor de equilíbrio do substrato e a pressão de vapor da água pura e seu valor varia de 0 até 1. Bactérias necessitam de maiores valores de a_w (a maioria não cresce com $a_w < 0,91$) e a presença de nutrientes aumenta o intervalo de a_w no qual o micro-organismo sobrevive (FELLOWS, 2000). As condições adversas, provocadas pela baixa a_w , provoca aumento da fase estacionária de crescimento celular e redução da velocidade de crescimento, reduzindo o tamanho da população final. São efeitos da baixa atividade metabólica, já que todas as reações químicas das células necessitam de água para acontecer. Quando a temperatura e pH do alimento são desfavoráveis, a a_w mínima necessária aumenta, e o acúmulo de solutos compatíveis é estratégia do micro-organismo para sobreviver à menor a_w (JAY, 2005).

2.6 MEDIÇÃO DE TEXTURA E COR EM ALIMENTOS

A textura de um alimento está relacionada com a consistência e as características de mastigação. As principais características da textura são dureza, maciez, fibrosidade e suculência. Esses parâmetros são determinados principalmente pelos teores de umidade e gordura, tipo e quantidade de carboidratos estruturais (celulose, amido, pectina) e pelas proteínas presentes no alimento (CELESTINO, 2010; FELLOWS, 2000).

As características de crocância são importantes para os alimentos desidratados. A textura crocante é uma qualidade desejável e está relacionada às características de dureza e fragilidade, além de produzir som típico durante a fraturabilidade (LUYTEN, PLIJTER e VLIET, 2004). Na tentativa de medir a textura fisiológica, os pesquisadores utilizam sensores de força e deformação, para simular a ação da mastigação (NISHINARI, 2009).

A deformação na ruptura relaciona-se com o quanto um material pode variar a altura sem ser rompido, ou seja, quanto maior a deformação, maior o tempo necessário para ocorrer a ruptura e menos quebradiço é o material (BRAGA e CUNHA, 2003). A crocância de um alimento está relacionada com a facilidade de fraturabilidade desse alimento. Materiais com maior plasticidade apresentam textura de goma e possuem maior capacidade de deformação antes de sua ruptura. O conteúdo de água de um alimento influencia nas características de plasticidade e crocância. Quanto menor o conteúdo de umidade maior é a crocância (ARIMI et al., 2010; MARZEC et al., 2007). A secagem de um sólido com alto teor de umidade que resulta na formação de um sólido quebradiço com baixo conteúdo de umidade a partir de um material semelhante à borracha, está relacionada com a transição vítrea da matriz de componentes solúveis, principalmente os açúcares (AGUILERA e STANLEY 1999).

A cor é um aspecto da percepção visual, cuja definição e quantificação são difíceis. Fisicamente, cor é uma característica da luz, mensurável em termos de intensidade (energia radiante) e comprimento de onda. Fisiologicamente, é limitada a banda do espectro no intervalo de 380 a 770 nanômetros, uma vez que o olho humano é praticamente insensível a outros comprimentos de onda de energia radiante (KRAMER e TWIGG, 1962; RUSSELL, 1981).

A percepção da cor é limitada pela existência de uma fonte de luz. Tal luz pode ser refletida, transmitida, absorvida ou refratada pelo objeto que está sendo iluminado. Quando praticamente toda energia radiante do espectro visível é refletida por uma superfície opaca, o objeto é visto branco. Se a luz é parcialmente absorvida, de forma homogênea através de todo espectro visível, o objeto é cinza. Se a absorção é praticamente completa, o resultado é um objeto negro. Se, no entanto, a energia radiante é absorvida em certo comprimento de onda de forma mais pronunciada que em outros, o observador humano vê o que popularmente é conhecido como cor,

fisicamente como o comprimento de onda dominante ou fisiologicamente como tonalidade (KRAMER e TWIGG, 1962; RUSSELL, 1981).

Cada objeto absorve e reflete luz em diferentes porções do espectro e em quantidades diferentes. Essa diferença na absorbância e reflectância é que torna diferentes as cores de alimentos distintos. Na análise objetiva de cores de objetos opacos, como na maioria dos alimentos, a reflexão possui maior importância, uma vez que sua reflectividade é que será medida. O alimento absorve parte dos comprimentos de onda da fonte de luz e reflete o restante. Essa luz refletida entra no olho humano e estimula a retina, sendo esse estímulo interpretado pelo cérebro como cor do objeto (RAMOS e GOMIDE, 2007).

Os parâmetros de cor são definidos pela reflectância de um feixe de luz disparado em direção da amostra. Os valores captados pelo colorímetro são matematicamente distribuídos em três eixos, de forma a criar um espaço tridimensional de determinação de cor denominado CIELAB.

Neste modelo temos os três eixos que são definidos por L^* , a^* e b^* , mostrados na FIGURA 3.

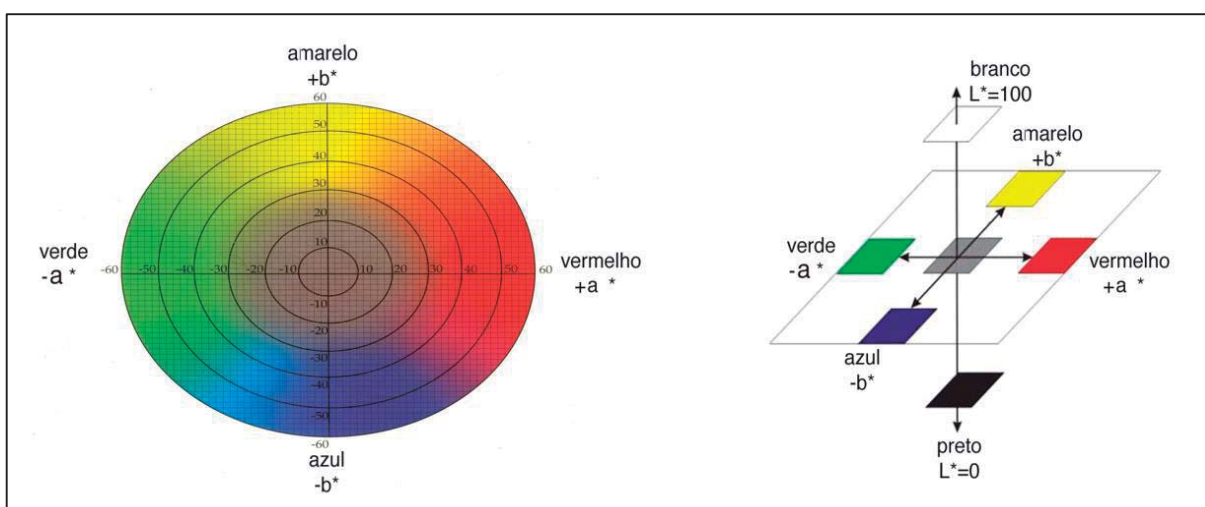


FIGURA 3 – MODELO DE COR CIELAB.

Fonte: O autor (2014) adaptado de SCHANDA (2007)

O eixo L^* varia de 0 (zero), que identifica a ausência de luz (corpo negro), a 100 (cem), que identifica o máximo de luminosidade (branco).

O eixo a^* pode variar entre valores negativos, que identifica tendência à cor verde, e valores positivos, que identifica tendência à cor vermelho.

Da mesma forma, no eixo b^* , valores negativos ou positivos indicam tendência ao azul ou ao amarelo, respectivamente.

2.7 TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

As técnicas termoanalíticas começaram a ser estudadas no início do século XX e empregavam instrumentação rudimentar. O aperfeiçoamento da instrumentação e a descoberta das aplicações dos resultados em vários setores científicos foram os principais fatores responsáveis pela evolução da instrumentação termoanalítica (IONASHIRO *et al.*, 2012).

Nos sistemas termoanalíticos a amostra é colocada em um ambiente cuja temperatura é controlada por um dispositivo programador e suas alterações são monitoradas através de um transdutor adequado, que produz um sinal elétrico de saída análogo à transformação ocorrida. Este sinal de saída, após a amplificação adequada, é aplicado a um instrumento de leitura. (IONASHIRO *et al.*, 2012, p. 7).

A termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) estão entre as técnicas mais utilizadas.

A termogravimetria mede a massa da amostra em função da variação controlada de temperatura ou tempo. A curva resultante fornece informações sobre a estabilidade térmica, decomposição térmica e quantificação do resíduo da amostra, se existir.

A termogravimetria derivada (DTG) é um recurso matemático que corresponde à primeira derivada da curva TG, que fornece picos, onde pode-se determinar com mais clareza, pontos que não são tão claros pela observação da curva TG, pois os picos, referem-se exatamente a qualquer variação na massa da amostra (COLMAN, 2013). Um exemplo das curvas TG e DTG podem ser na FIGURA 4. A curva TG/DTG do calcário foi utilizada por ser um exemplo excelente do aspecto do evento de perda de massa.

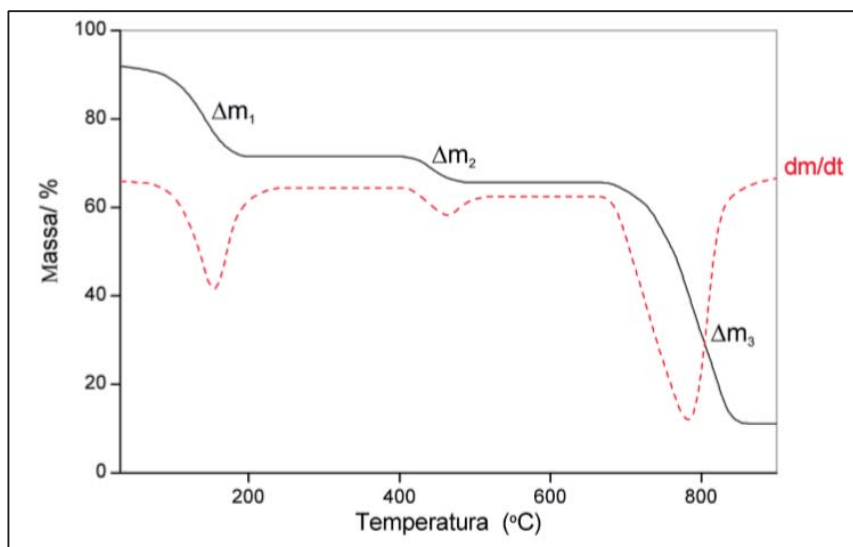


FIGURA 4 – CURVA TG/DTG DO CALCÁRIO

Δm_1 :primeira perda de massa; Δm_2 :segunda perda de massa; Δm_3 :terceira perda de massa. Linha pontilhada corresponde a derivada da curva TG (DTG).

Fonte: IONASHIRO *et al.*, 2012

A curva TG da FIGURA 4 indica que a decomposição térmica se dá em três etapas consecutivas. A partir da curva DTG fica mais fácil detectar onde a velocidade de decomposição é máxima (ponto de inflexão da curva TG). A temperatura de pico (T_p) corresponde à máxima velocidade de perda de massa e as temperaturas inicial e final (T_i e T_c , respectivamente) associadas aos processos de perda ou ganho de massa podem ser determinadas na curva DTG (IONASHIRO *et al.*, 2012).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é a medida de diferença de energia fornecida entre a amostra e um material de referência em função da temperatura ou tempo, durante o processo de aquecimento ou resfriamento de ambos. O registro dessa variação é a curva DSC, mostrada da FIGURA 5. Segundo IONASHIRO (2012) essa técnica possibilita estudos dos efeitos de calor associados a alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento, alterações de estruturas cristalinas) ou reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de oxidação-redução, etc., capazes de causar variações de entalpia (ΔH). Transições que envolvem variações de entropia, são denominadas transições de segunda ordem, das quais a mais comum é a transição vítrea (T_g). A DSC é provavelmente a metodologia mais comum para medir a T_g de sistemas alimentares (ROOS, 2010).

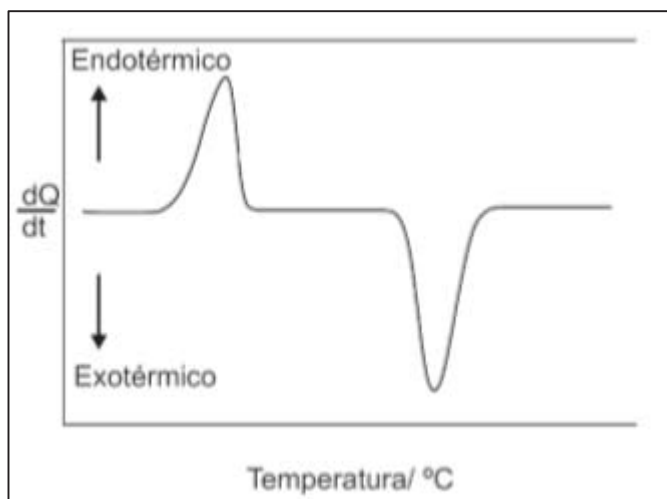


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DE CURVA DSC TÍPICA
 Fonte: IONASHIRO *et al.*, 2012

As temperaturas dos picos formados pela curva DSC são determinadas conforme a FIGURA 6. A temperatura de início (T_0 , *onset*) é a temperatura onde a linha tangencial à temperatura mais baixa do pico se cruza com a linha de base e a temperatura final (T_F) está no ponto de intersecção da linha de base com a tangente à temperatura mais alta do pico (ALTAY e GUNASEKARAN, 2006).

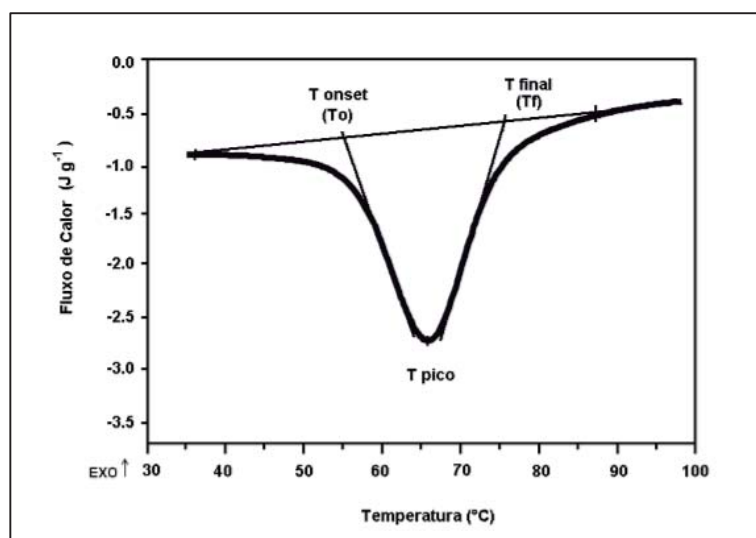


FIGURA 6 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TEMPERATURAS DOS PICOS NA CURVA DSC
 Fonte: adaptado de ALTAY e GUNASEKARAN (2006)

2.7.1 Temperatura de Transição Vítrea

A transição vítrea é a principal transição de fases observada em componentes amorfos, sendo a mais comum em alimentos (LE MESTE, *et al.* 2002). Os alimentos são compostos por diferentes componentes e por essa razão, geralmente existem em um estado de não-equilíbrio amorfo. Os sólidos amorfos formados têm a estrutura de um líquido, mas na fase sólida. Um sólido amorfo também é chamado de vidro e é caracterizado por uma transição vítrea, que se refere à transição de fase do vidro gomoso, resfriado para se tornar sólido. A transição vítrea é um parâmetro importante para compreender os mecanismos dos processos de transformação em alimentos e controlar sua vida de prateleira (BHANDARI e HOWES, 1999).

Em um processo de aquecimento, a transição vítrea resulta no aumento do movimento translacional das moléculas e começam a aparecer características de substâncias líquidas no sólido. Na FIGURA 7, observa-se a transição vítrea caracterizada por uma alteração da linha base da curva DSC, onde ocorre aumento da mobilidade molecular em torno da transição vítrea pelo decréscimo exponencial de características de elasticidade e viscosidade, quando um material é aquecido (ROOS, 2010).

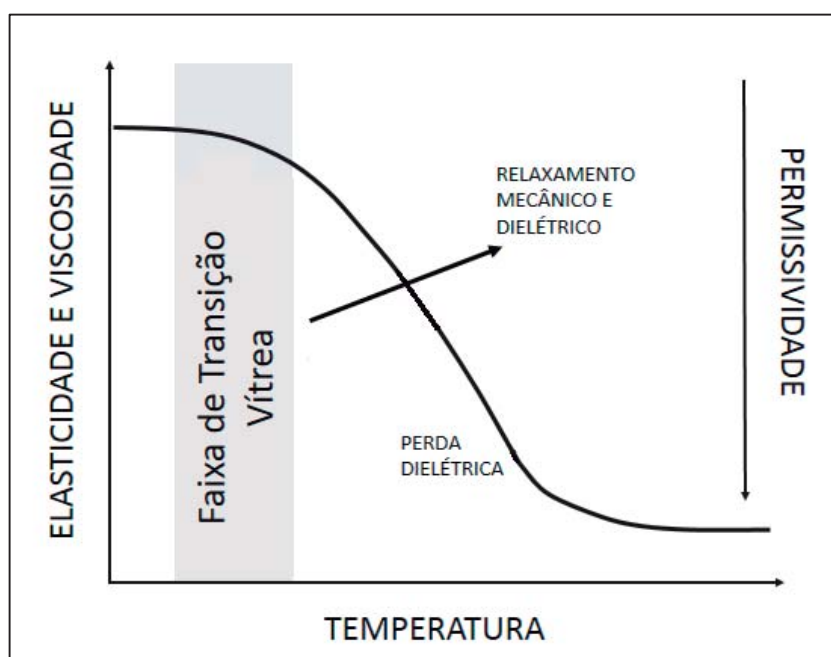


FIGURA 7 – CURVA DSC MOSTRANDO ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES DIELÉTRICAS E MECÂNICAS DOS MATERIAIS APÓS A TRANSIÇÃO VÍTREA.
Fonte: Adaptado de ROOS (2010)

A transição vítrea pode ser observada na maioria dos alimentos sólidos, hidrofílicos e com baixo teor de gordura. Esses sólidos formam fortes interações com a água por pontes de hidrogênio. Carboidratos e açúcares apresentam forte dependência do conteúdo de água com a temperatura de transição vítrea, como resultado da plasticização (ROOS, 2010). Como o yacon possui mais de 85 % de carboidratos (base seca), sendo 64 % de oligofrutanos, 14 % de frutose, 19 % de sacarose e 3 % de glicose, sugere que podemos observar a transição vítrea que ocorre durante a secagem (GRAEFEEA *et al.*, 2004).

2.7.2 Atividade de água e transição vítrea

O uso de valores de a_w para alimentos de umidade intermediária (15-50 %) tem sido questionado por diversos pesquisadores, que sugeriram que “a dinâmica da água” pode ser a melhor forma de prever a atividade microbiana em tais sistemas. A dinâmica da água refere-se à matriz amorfa de componentes alimentares que são sensíveis a mudanças de umidade e temperatura. A matriz pode apresentar uma estrutura tipo um “vidro muito viscoso” ou uma “borracha líquida” amorfa. Desse modo, o estado vítreo refere-se ao aumento da viscosidade de um sistema aquoso amorfo, e o resultado tipo “borracha líquida” resulta na inibição ou lentidão do fluxo. No estado vítreo, a cristalização de constituintes é limitada. A transição do estado vítreo para o estado de borracha ocorre sob uma faixa de temperatura característica, T_g , e esta diminui com o aumento da umidade. Assim a T_g foi proposta como um parâmetro melhor que a a_w para prever a estabilidade microbiana nesses alimentos (JAY, 2005).

Além da estabilidade microbiana, o estado da matriz alimentar (vítreo ou gomoso) é importante para prever as propriedades físicas e mecânicas, estabilidade de produtos desidratados, bebidas e comidas instantâneas e a viabilidade de sementes estocadas por longos períodos (MATVEEV, GRINBERG e TOLSTOGUZOV, 2000).

2.7.3 Decomposição térmica de sacarídeos

O aquecimento de alimentos ricos carboidratos, acima de 100 °C, pode provocar reações de decomposição térmica, em particular caramelização e fusão dos açúcares (CHERIEGATE, 2012).

A reação de caramelização ocorre a altas temperaturas, na presença ou ausência de catalisadores (ácidos, bases, sais ou impurezas). Pode ser observada em soluções concentradas e diluídas e em alimentos na forma cristalina (QUINTAS, *et al.*, 2007). Quando calor é aplicado sobre sacarose e açúcares redutores, em ausência de compostos nitrogenados, promove um complexo grupo de reações que resulta em escurecimento não enzimático do alimento. O produto final contém uma mistura complexa de compostos poliméricos, formados a partir de compostos cíclicos (anéis de cinco e seis elementos) insaturados, além de compostos de aroma e sabor. O aquecimento causa desidratação da molécula de açúcar com a introdução de ligações duplas ou a formação de anéis anidro. Cerca de 40 % da massa de carboidrato é liberado na forma de água, como produto da reação primária de caramelização durante a decomposição térmica da D-glicose a 300 °C (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; HEYNS, STUTE, PAULSEN 1966, citado por KROH, 1994).

A fusão de açúcares faz parte das reações de decomposição termodinâmica de alimentos ricos em carboidratos e possui comportamento característico na curva DSC como um pico endotérmico fino, observado para açúcares puros ou misturas de sacarídeos (LEE *et al.* 2011). O MERCK INDEX (1989) apresenta a temperatura de início de decomposição da sacarose e da frutose como sendo de 160 °C e 103 °C, respectivamente.

Quando a análise de DSC é aplicada em um alimento, que, em grande parte, é uma mistura de compostos, o pico da curva DSC não é bem definido, e não pode-se afirmar que a reação de decomposição é somente fusão (CHERIEGATE, 2012), mesmo ocorrendo na faixa de temperatura de fusão dos principais carboidratos presentes na amostra. As temperaturas de fusão dos principais sacarídeos do yacon são bastante estudadas. HURTTA, PITKÄNEN e KNUUTINEN (2004) descrevem diversos valores para temperatura de pico de padrões de frutose (T_p 113 °C), mistura de sacarose:frutose, 90:10, (T_p 179 °C), sacarose (T_p 188 °C) e glicose (T_p 158 °C).

Os autores deste trabalho concluíram que as variações das razões de aquecimento podem influenciar a característica das curvas de DSC e as temperaturas dos eventos enquanto LEE et al. (2011) sugere que a presença de açúcares redutores e sais podem acelerar a decomposição térmica da sacarose.

Diferentes tipos de oligossacarídeos foram investigados a fim de revelar suas características de degradação térmica. Polímeros e oligômeros de D-frutose e D-glicose foram expostos a temperaturas elevadas (150 °C a 170 °C, 190 °C, 210 °C e 220 °C) durante 10 min. Esta duração do tratamento térmico faz com que seja possível fazer um levantamento de intermediários formados, já que não é tempo suficiente para realizar a fragmentação total em monômeros. Análise HPLC e ELS (método de detecção de espalhamento de luz) foram as técnicas aplicadas para a detecção confiável dos carboidratos. Os resultados obtidos apontam para o aumento do grau de degradação da cadeia do carboidrato a temperaturas elevadas. Prevalência de oligômeros com menor comprimento de cadeia e formação de açúcares monoméricos (D-glicose e D-frutose) foram observados nas maiores temperaturas aplicadas. Um modelo matemático explicou as reações de degradação e clivagem da molécula de oligossacarídeo com o aumento da temperatura aplicada (FORGO *et al.*, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA E PROCESSO DE SECAGEM

O yacon (*S. sonchifolius*), cultivado no estado de São Paulo, Brasil, foi adquirido do centro de suprimentos CEASA – Curitiba, Paraná, Brasil. As raízes foram selecionadas e estocadas a 8°C por no máximo 24 horas. Foram então lavadas, descascadas, cortadas em fatias de 0,3-0,5 cm de espessura, em um fatiador automático. Imediatamente, as fatias foram branqueadas em solução de 500 mg.L⁻¹ de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅) por 15 minutos, a temperatura ambiente (25±2 °C) para inativar enzimas e evitar o escurecimento enzimático (JAY, 2005).

Um secador convectivo de bandejas foi utilizado para secar as fatias em duas temperaturas (45 ou 70°C), com ar passando pelo alimento, na velocidade média de 1,2 m.s⁻¹, de acordo com o fluxograma descrito na FIGURA 6. Ao final do processo de secagem, o secador foi aberto e as bandejas descarregadas (operação em batelada). O controle do final do processo foi feito pesando uma pequena bandeja com amostra do produto, até que o peso se mantivesse constante (CELESTINO, 2010).

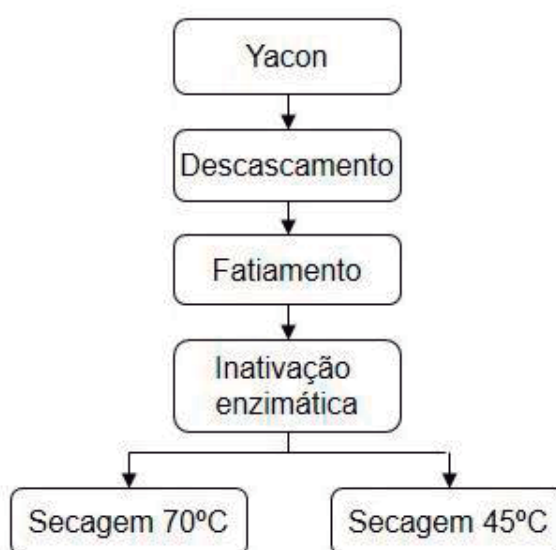


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SECAGEM DE YACON FATIADO.
Fonte – O autor (2014)

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O teor de cinzas e umidade foram determinados por metodologias oficiais, IAL (2008) e AOAC nº 925.10 (AOAC, 1997), respectivamente.

O cadinho de porcelana foi incinerado, resfriado e tarado para receber cerca de 5 g de amostra. O conjunto foi então incinerado em mufla a 600 °C, até não restar nenhum resíduo preto de matéria orgânica, colocado em dessecador para resfriar e pesado quando na temperatura ambiente. O teor de cinzas foi estabelecido pela diferença de peso entre o cadinho vazio e o conjunto (IAL 2008).

Cerca de 5 g da amostra foi pesada em cadinho, previamente seco e tarado, e colocada em estufa à 105 °C até peso constante. O teor de umidade é determinado pela diferença entre o peso do cadinho mais a amostra, antes e depois da análise, ou seja, a água evaporada (AOAC, 1997).

A atividade de água foi medida diretamente em higrômetro Aqualab 3TE após equilíbrio das amostras a 25 °C.

O valor de pH da amostra foi determinado por método potenciométrico de acordo com AOAC nº 925.10 (AOAC, 1997).

3.3 PERFIL DE TEXTURA E MEDIDAS DE COR

O perfil de textura foi determinado em Texturômetro (CT3, Brookfield), com ponta de prova esférica em aço inoxidável com 12,7 mm de diâmetro (TA-18) e base ajustável com garras (TA-AVJ), com profundidade de penetração de 0,6 mm, velocidade 0,5 mm.s⁻¹ e carga de 0,24 N, como variável resposta, o tempo necessário para a ruptura da fatia.

Os parâmetros de cor foram determinados em espectrofotômetro de reflectância, MiniScan XE 45/0-L Plus (Hunter Inc, USA), que consiste em três componentes de cor: L*, a* e b*. A cor foi determinada por 27 medições nas fatias de yacon desidratado à 45 °C e 70 °C, avaliada pelo parâmetros L*, variação de luminosidade de zero (preto) até 100 (branco); valores positivos ou negativos de a*, indicando tendência ao vermelho ou ao verde, respectivamente; e b*, com valores

positivos ou negativos, indicando tendência ao amarelo ou azul, respectivamente (DUANGMAL, SAICHEUA, SUEEPRASAN, 2008).

3.4 ANÁLISES TÉRMICAS

As fatias foram moídas em liquidificador Walita (RI2034) e peneiradas para padronizar a granulometria (48 mesh), a fim de melhorar a precisão dos resultados das análises térmicas.

3.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em equipamento DSC-Q200 (TA Instruments, EUA), e objetivaram estudar o processo de transição vítrea e o comportamento térmico de cada amostra. As amostras foram aquecidas de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando cadinho de alumínio hermeticamente fechado e aproximadamente 8 mg de cada amostra, sob um fluxo de ar com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ na razão de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. O equipamento foi previamente calibrado com Índio (99,99% de pureza), com ponto de fusão em $156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\Delta H = 28.56\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$. Os resultados foram calculados com o programa Universal Analysis 2000 (ANDRADE *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

3.3.2 Técnicas Acopladas: Termogravimetria – Calorimetria Exploratória Diferencial (TG-DSC)

As curvas TG-DSC foram obtidas com o sistema de análise térmica TGA-DSC 1 STAR^e (de Mettler Toledo Co.), sob as seguintes condições ambientais: aproximadamente 20 mg de amostra em cadinho de alumina aberto (com capacidade para 70 μL), aquecida à uma razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $750\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob um fluxo

de ar com vazão de 100 mL.min⁻¹. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de oxalato monoidratado de cálcio, conforme a literatura (ANDRADE *et al.*, 2014; ALBERTON *et al.*, 2014) e o manual do equipamento.

3.5 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O yacon desidratado à 70°C foi avaliado quanto à sua composição centesimal. O teor de gorduras e proteínas foi determinado por metodologia oficial, gordura pelo método de Soxhlet (IAL, 2008) e nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

Cerca de 5 g da amostra foi pesada em papel de filtro e amarrado com fio de lã previamente desengordurado. O cartucho formado foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet e o extrator foi acoplado à um balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Quantidade suficiente para um Soxhlet e meio de hexano foi adicionada, o sistema foi acoplado a um refrigerador a água corrente (condensador) e chapa elétrica manteve o aquecimento para extração contínua por 6 horas. Após retirar o solvente, o balão foi transferido com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, por uma hora, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado, até peso constante. O teor de gordura foi determinado pelo peso do resíduo retido no balão de fundo chato (IAL, 2008).

O método de Kjeldahl baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico para digestão, até que carbonos e hidrogênios sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônia. Adiciona-se NaOH concentrado e aquece-se para liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônia, dosado com uma solução de HCl padronizada. A quantidade molar de HCl utilizada na titulação é a mesma de mols de nitrogênio. Os valores de nitrogênio foram multiplicados pelo fator de conversão 6.25 para obtenção do teor de proteína (AOAC, 1995).

Os mesmos métodos descritos anteriormente foram utilizados na determinação de cinzas (IAL, 2008) e umidade (AOAC, 1997).

A quantificação de fibra alimentar foi feita por método oficial AOAC – 985.29 (2011) em laboratório credenciado. Os carboidratos foram quantificados por diferença.

3.6 OBTENÇÃO DA BIOMASSA

A cultura liofilizada de *Lactobacillus casei* (LC-01) foi comprada da empresa Christian Hansen® (Valinhos, São Paulo, Brasil), e foi ativada por inoculação de 0,2 g em 5 mL de caldo MRS (HIMEDIA®) e incubada a 37 °C por 24 horas sob condições aeróbicas. Decorrido este tempo, 1% (V/V) foi transferido para 10 mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 horas (pré-inóculo). Para obtenção da biomassa, 1% (V/V) do pré-inóculo foi transferido para 300mL de caldo MRS e re-incubado nas mesmas condições. A biomassa foi separada por centrifugação em centrífuga refrigerada (Himac® CR21GII) a 14000 g (10000 rpm) por 10 min à 4 °C e lavada três vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril conforme GUERGOLETTTO, *et al.* (2010).

3.7 ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DO LC-01 EM YACON DESIDRATADO À 70 °C

O yacon foi desidratado conforme FIGURA 8 (página 42), na temperatura de 70 °C e moído em flocos. A biomassa lavada foi ressuspensa em 300 mL de solução salina estéril 0,85% (p/v) e misturada à 100 g de amostra. As amostras homogeneizadas obedeceram o delineamento experimental dos tratamentos A, B, C e D, com 3 repetições, por 60 minutos. Os processos A e C ocorreram à 25±2 °C, enquanto que os processos B e D aconteceram sob 37 °C. Os processos C e D receberam 100 mL de solução de trealose 0,4 mM adicionada à biomassa centrifugada, como mostra o fluxograma da FIGURA 9 (GUERGOLETTTO, *et al.* 2010).

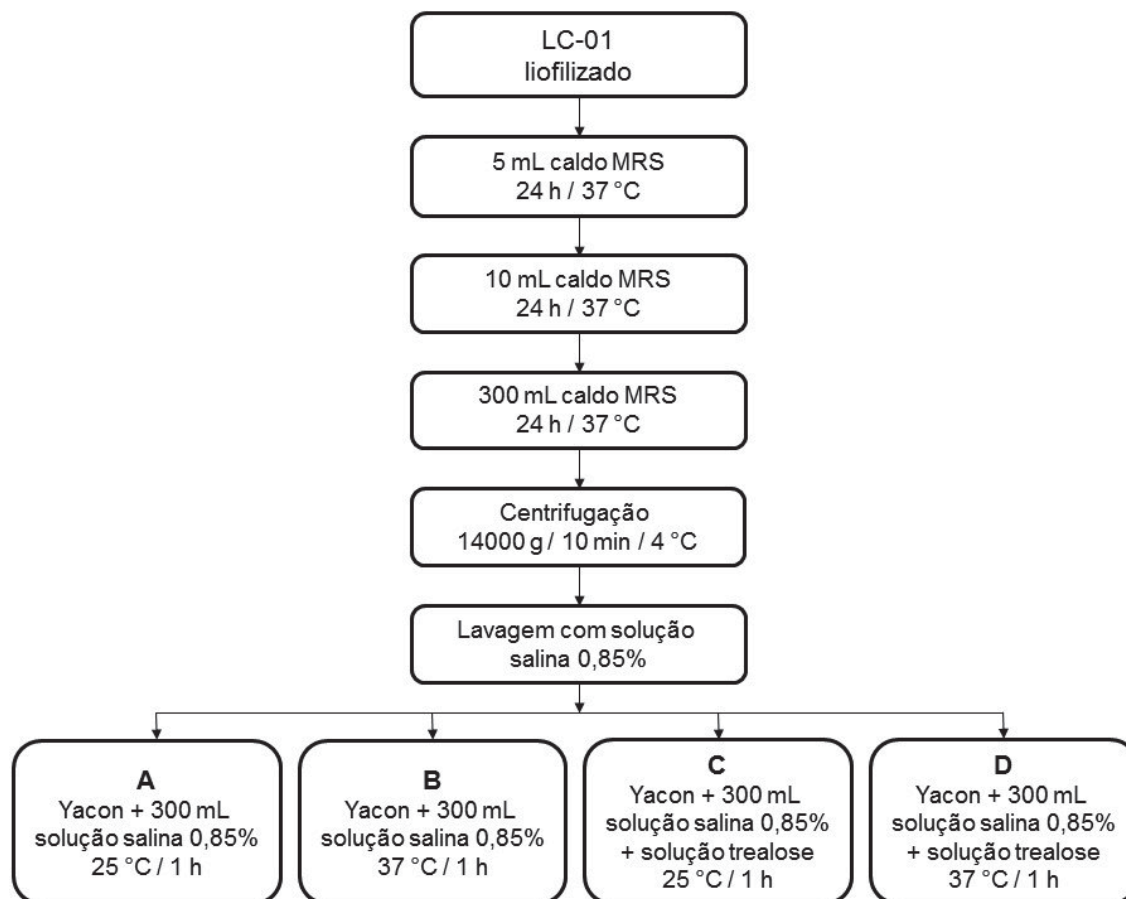


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PREPARO E INCORPORAÇÃO DA BIOMASSA DE LC-01 EM YACON DESIDRATADO EM FLOCOS
Fonte – O autor (2014)

Após a incorporação da biomassa, o yacon foi distribuído em bandejas, sobre tela de algodão, e seco à 40°C, em estufa de circulação de ar, com velocidade média do ar de 1,2 m.s⁻¹, até peso constante. Foi acondicionado à vácuo e armazenado à temperatura ambiente (25±2 °C) até análise, no máximo por 60 dias.

3.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A quantidade de *Lactobacillus casei* na biomassa e aderido ao yacon desidratado foi determinada conforme (SANTIVARANGKNA, KULOZIK, e FOERST, 2006; VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992). Em 10 g da amostra foram adicionados 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (AP) (Himedia®, Mumbai, India), seguido de agitação e de diluições decimais seriadas em 9 mL de AP, sendo utilizadas

para semeadura por profundidade em placas com ágar *De Man Rogosa Sharp* (MRS) (acumedia®, Lansing Michigan 48912) preparado conforme a recomendação do fabricante, em triplicata. Ambiente de anaerobiose foi criado com uma camada extra do meio de cultura. As placas foram empilhadas de forma invertida, acondicionadas em filme plástico (PVC) para evitar trocas gasosas e incubadas à 37 °C por 72 h. Ao final do período de incubação as colônias foram contadas e o total foi multiplicado pela recíproca da diluição utilizada. O resultado foi expresso em Log UFC.g⁻¹.

3.9 SOBREVIVÊNCIA DO LC-01 ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS SIMULADAS

A tolerância ácida foi verificada pela adição de 1 g de yacon em flocos, com LC-01 aderido, em 9 mL de solução esterilizada de 0,08 M HCl (Biotec®) contendo 0,2% NaCl, pH 1,5. O material foi incubado a 37 °C por 30, 60, 90 ou 120 min. No teste de resistência aos sais biliares, 1 g da amostra foi adicionado à 9 mL da solução de 0,05 M KH₂PO₄ (Neon®) contendo 0,6% de sais biliares (Sigma-Aldrich®), em pH 7,4, e incubado a 37 °C por 150 min. Após esse período, a viabilidade de LC-01 foi determinada em ágar MRS e incubado a 37 °C por 72 h (GUERGOLETTO, *et al.* 2010).

As amostras avaliadas foram produzidas conforme o Tratamento A (FIGURA 9) e avaliada nos tempos 1, 14, 28, 42 e 56 dias de armazenamento.

A porcentagem de células sobreviventes às condições gástricas simuladas foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 1.

$$\% \text{ células sobreviventes} = \frac{\text{Log UFC.g}_{\text{final}}^{-1}}{\text{Log UFC.g}_{\text{inicial}}^{-1}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: Log UFC.g_{Final}⁻¹ é a quantidade de células encontradas no yacon após simulação gástrica; Log UFC.g_{inicial}⁻¹ é a quantidade de células encontradas no yacon antes da simulação gástrica.

3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Foi aplicada para as amostras do Tratamento A (FIGURA 9) nos tempos 1, 14, 28, 42 e 56 dias de armazenamento. Aproximadamente 10 mg da amostra foram fixada em fita dupla face no stub do equipamento. Foram cobertas por uma fina camada de ouro em metalizador (Shimadzu IC50) de acordo com metodologia de TONELI *et al.* (2008). O microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu SSX-550) foi operado a 15 kV. As imagens obtidas foram aumentadas em 2400 ou 3500 vezes.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média (\pm desvio padrão). Inicialmente, as variáveis de resposta foram avaliadas em relação à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, o teste de Levene foi empregado para a avaliação da homocedasticidade quando $n \geq 3$, ao passo que quando dois tratamentos eram comparados, o teste F foi aplicado. Diferenças estatísticas significativas foram avaliadas pela análise de variância univariada ($n \geq 3$ tratamentos), seguida do teste de Fisher para diferenças mínimas significativas. Quando dois tratamentos precisaram ser comparados, o teste t-Student (dados paramétricos) ou o teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos) foram aplicados. A análise de regressão foi aplicada para avaliar a influência do tempo na sobrevivência dos probióticos frente ao armazenamento e condições gástricas simuladas. O método dos mínimos quadrados ordinários foi utilizado para propor o modelo de regressão, sendo que o modelo de regressão foi avaliado quanto ao seu ajuste utilizando o coeficiente de determinação (r^2) e a probabilidade da regressão (p-valor). P-valores abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (GRANATO, CALADO, JARVIS, 2014). Em todas as análises, o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) foi empregado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A FIGURA 10 apresenta os valores médios de tempo de ruptura, porcentagem de umidade, atividade de água (aw) e cinzas para as fatias de yacon desidratado à 45 e 70°C. Valores de probabilidade obtidos pelo teste t-student para amostras independentes (tempo de ruptura e cinzas) e pelo teste mann whitney (umidade e aw).

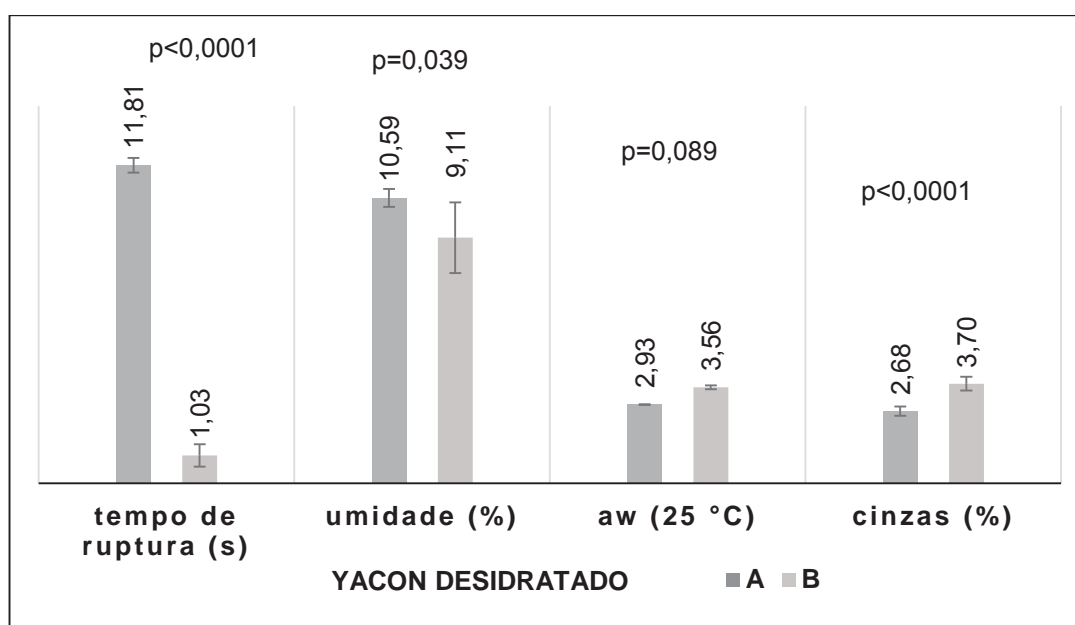


FIGURA 10: MÉDIAS DOS VALORES DE TEMPO DE RUPTURA (s), UMIDADE (%), AW E CINZAS (%) PARA YACON DESIDRATADO À 45 °C (A) E 70 °C (B).

Fonte: O autor (2014).

As fatias de yacon desidratado à 70°C apresentaram maior crocância, pois o rompimento das fatias aconteceu, em média, com $1,03 \pm 0,41$ segundos de aplicação de força sobre a amostra. Valor estatisticamente diferente ao tempo de ruptura da fatia do yacon desidratado à 45 °C $11,81 \pm 0,27$. A principal característica do alimento crocante é a facilidade de quebra mediante tensão. Alimento quebradiço necessita de menor tempo de aplicação de força para atingir o ponto de quebra, enquanto que o alimento dúctil, sofre deformação antes de se romper. Quando um alimento dúctil sofre a ação de alguma força, as tensões internas resultantes são inicialmente absorvidas

e causam deformação nos tecidos. Se o estresse é mantido, a tensão atinge o ponto de quebra (FELLOWS, 2000). Desta forma, as fatias desidratadas à 45°C apresentaram característica dúctil, quando comparadas com as fatias desidratadas à 70 °C, pois seu tempo de aplicação da força até ruptura da fatia foi cerca de 11 vezes maior.

Os valores de umidade e cinzas foram diferentes estatisticamente para as amostras desidratadas em temperaturas diferentes. Quando a temperatura de secagem é maior, maior é a velocidade de saída da água do alimento para o ar de secagem, pois maior é o gradiente de temperatura entre o ar de secagem e a amostra. No entanto, os valores de atividade de água não foram influenciados pela temperatura de secagem ($p > 0,05$).

Valores médios das medições dos parâmetros de cor estão apresentados na TABELA 1. P-valores foram obtidos pelo teste t-student para amostras independentes.

TABELA 1 – MÉDIAS DOS VALORES DE L^* , a^* e b^* PARA YACON DESIDRATADO À 45 °C (A) E 70 °C (B).

Tratamento	L^*	COR	
		a^*	b^*
45 °C	65.92 (± 5.63)	2.78 (± 1.72)	33.45 (± 4.95)
70 °C	53.03 (± 7.03)	6.78 (± 1.81)	33.44 (± 4.92)
P valor	<0.0001	<0.0001	0.977

FONTE: O autor (2014).

As amostras desidratadas à 70 °C apresentaram coloração mais escura, $L^* = 53.03 (\pm 7.03)$, e com maior tendência para o vermelho, $a^* = 6.78 (\pm 1.81)$ quando comparada com a amostra desidratada à 45 °C, que apresentou coloração mais clara e amarelada. Podemos observar a diferença na coloração pela FIGURA 11.



FIGURA 11 – DIFERENÇA DE COR ENTRE AS FATIAS DE YACON DESIDRATADO A 45 °C (A) E A 70 °C (B)

Fonte: O autor (2014)

Quanto maior a temperatura de secagem convectiva, maior será a alteração da cor (HENRIQUES, GUINÉ, BARROCA, 2012). O escurecimento pode ser explicado pela reação de Maillard, já que os polifenóis foram inativados pelo metabissulfito de sódio na preparação da matéria-prima, descartando o escurecimento enzimático. Açúcar redutor e fontes de amins, como proteínas, peptídeos e aminoácido, são necessários e a temperatura afeta a velocidade e o mecanismo da reação de Maillard. A velocidade de escurecimento aumenta com o aumento da temperatura (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

4.2 TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

4.2.1 Técnicas Acopladas: Termogravimetria – Calorimetria Exploratória Diferencial (TG-DSC)

A curva TG mostrou em que temperatura ocorreu perda de massa da amostra que foi aquecida de 30 °C até 800 °C, enquanto que a curva DSC nos fornece a quantidade de energia envolvida no evento térmico e mostra o comportamento da decomposição térmica do material analisado. Os valores de perda de massa e as

faixas de temperatura dessas perdas estão na TABELA 2, juntamente com as temperaturas dos picos (T_p) da curva DSC.

TABELA 2 – RESULTADOS DE TG-DSC PARA AMOSTRAS A E B

AMOSTRA	ETAPAS	TG		DSC
		Δm (%)	ΔT (°C)	T_p (°C)
A	1°	6,59	30-157	102,35
	2°	42,07	157-265	246,37
	3°	18,49	265-382	313,38
	4°	30,28	382-613	490,68
B	1°	5,91	30-131	119,26
	2°	42,46	159-297	224,35
	3°	17,16	297-400	307,04
	4°	29,29	383-653	455,02

A amostra seca a 45 °C, B amostra seca a 70 °C

FONTE: O autor (2014)

As curvas de comportamento térmico produzidas pelas técnicas acopladas são mostradas nas FIGURAS 12 e 13, amostra A e B respectivamente. Os resultados das análises de termogravimetria mostraram 4 etapas distintas de perda de massa e a curva DSC mostrou duas reações endotérmicas e duas exotérmicas.

Como observado na curva TG da amostra A, as principais perdas de massa ocorreram em 4 etapas; a primeira que aconteceu na faixa de temperatura de 30-157 °C com 6,59 % de perda da massa inicial foi devido à desidratação da amostra. A curva DSC mostrou um pico endotérmico na mesma faixa de temperatura (102,35 °C).

A segunda principal perda de massa foi observada entre 157 °C e 265 °C (42,07 %) e a terceira entre 265 °C e 332 °C (18,49 %). A curva simultânea de DSC mostrou um pico endotérmico ($T_p = 247,37$ °C) seguido de um pico exotérmico ($T_p = 313,38$ °C) possivelmente devido à diversas reações, como caramelização, quebra da ligação glicosídica e fusão dos açúcares (LEONE *et al.*, 2014; CHERIEGATE, 2012; HEYNS, STUTE, PAULSEN 1966, citado por KROH, 1994), e decomposição da matéria orgânica, respectivamente. Em seguida um grande pico exotérmico foi observado ($T_p = 490,68$ °C) atribuído a oxidação da matéria orgânica, gerando cinzas. O resíduo mineral determinado foi de 2,57%, igual ao valor encontrado pela análise físico-química, $2,68 \pm 0,17$ %, conforme FIGURA 10.

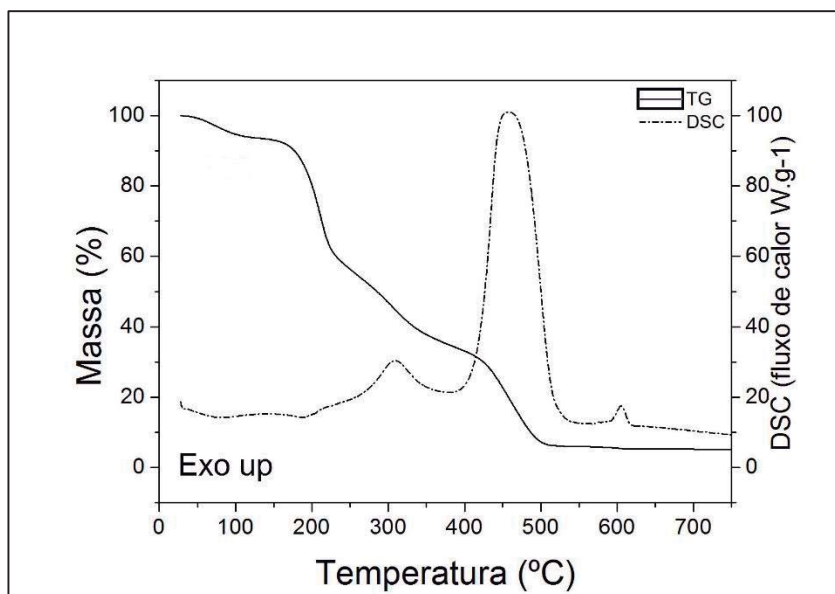


FIGURA 12 – TG-DSC YACON SECO A 45 °C – AMOSTRA A
 Fonte: O autor (2014)

O comportamento das curvas da amostra B foi o mesmo, porém em diferentes temperaturas (FIGURA 13).

O primeiro evento da curva B (30-131 °C) foi a desidratação da amostra, perdendo 5,91 % da massa inicial. A curva DSC mostrou um pico endotérmico na mesma temperatura (119,26 °C). A segunda, e principal perda de massa, foi observada entre 159 °C e 297 °C (42,46 %) e a terceira entre 297 °C e 400 °C (17,16 %). A curva simultânea de DSC mostrou um pico endotérmico ($T_p = 224,35$ °C) seguido de um pico exotérmico ($T_p = 307,04$ °C) como caramelização, quebra da ligação glicosídica e fusão dos açúcares (LEONE *et al.*, 2014; CHERIEGATE, 2012; HEYNS, STUTE, PAULSEN 1966, citado por KROH, 1994) e decomposição da matéria orgânica, respectivamente. O pico exotérmico observado em $T_p = 455,02$ °C, foi atribuído a oxidação da matéria orgânica. O valor do resíduo foi de 5,18 %, maior que o encontrado pelas análises físico-químicas, $3,70 \pm 0,25$ %, como mostrado na FIGURA 10.

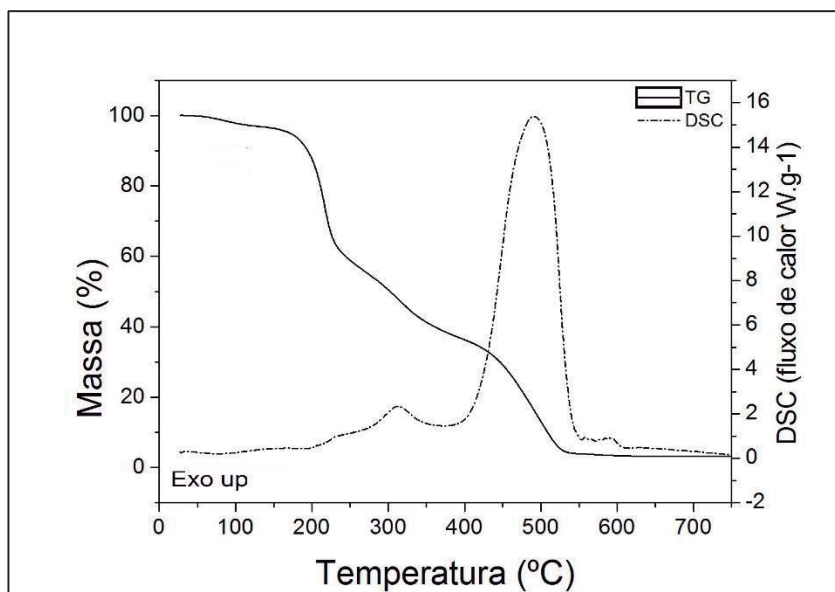


FIGURA 13 – TG-DSC YACON SECO A 70 °C – AMOSTRA B
 Fonte: O autor (2014)

A curva TG pode sofrer influência de características da amostra, como tamanho da partícula, quantidade, calor de reação, compactação, natureza e condutividade térmica (IONASHIRO, *et al.*, 2012), podendo explicar as pequenas diferenças nas temperaturas de ocorrência do evento térmico, encontradas nas curvas TG-DSC das amostras A e B. A amostra A perdeu mais água que a amostra B, porque seu conteúdo de umidade é maior (FIGURA 10).

Um pequeno pico exotérmico foi observado nas curvas DSC das duas amostras, após 600 °C, aparentemente sem ocorrência de perda de massa. Foi considerado parte integrante do último evento térmico da curva (oxidação da matéria orgânica), conforme TABELA 2. Isso pode ocorrer devido à compactação da amostra no cadinho, podendo haver espaços vazios entre as partículas da amostra, dificultando a troca de calor e retardando parte do evento térmico. Para evitar isso, recomenda-se espalhar a amostra em camada fina e fazer fluir um gás inerte através do forno (IONASHIRO, *et al.*, 2012).

4.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC (FIGURAS 14-16) foram obtidas a fim determinar a temperatura de transição vítrea das amostras, por esta razão, a amostra foi aquecida de -50 °C até 300 °C. Os valores das temperaturas de início, pico e conclusão de cada evento térmico estão na TABELA 3.

TABELA 3 – RESULTADOS DE DSC PARA AMOSTRAS DE YACON DESIDRATADO A 45 °C (A) e 70 °C (B)

AMOSTRA	EVENTO	T ₀ (°C)	T _P (°C)	T _C (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
	1	149,03 (±0,26)	184,84 (±0,04)	195,73 (±5,97)	40,78 (±0,83)
	2	206,62 (±0,27)	217,87 (±0,02)	232,91 (±0,34)	45,41 (±2,21)
	1	170,95 (±0,81)	192,10 (±0,01)	196,43 (±0,26)	16,35 (±1,06)
	2	210,92 (±0,02)	220,72 (±0,01)	233,77 (±0,13)	46,42 (±0,51)

T₀ “onset” temperatura inicial, T_P temperatura de pico, T_C “endset” temperatura de conclusão, ΔH entalpia do fenômeno térmico, T_g temperatura de transição vítrea
 FONTE: O autor (2014)

Dois eventos térmicos principais foram observados após leve mudança na linha de base entre 38,36±0,67 °C e 59,44±0,51 °C, com temperatura média de 55,87±0,33 °C (FIGURA 14). Esse comportamento na curva DSC é semelhante ao fenômeno térmico de transição vítrea, já que não houve mudança de entalpia durante o evento. Pode-se observar melhor esse fenômeno em escala aumentada, na FIGURA 16, na página 59. A transição vítrea da amostra B, mostrada na FIGURA 15, ocorreu entre as temperaturas de 36,51±0,59 °C e 64,63±1,59 °C, com temperatura média de 55,26±0,23 °C.

A temperatura média da transição vítrea não corresponde ao valor da média aritmética do intervalo de temperatura que compõe o fenômeno.

Posteriormente, ocorreu um pico endotérmico, chamado de Evento 1, sugerindo início das reações de decomposição dos açúcares, como caramelização, quebra da ligação glicosídica e fusão, aumentando a quantidade de carboidratos com menor grau de polimerização, como sacarose, frutose e glicose (FORGO, *et al.*, 2013; GRAEFA *et al.*, 2004). Os valores das temperaturas de início, pico e conclusão do evento estão na TABELA 3. Essa decomposição da amostra A precisou de 40,78±0,83 J.g⁻¹ para acontecer em uma temperatura de pico T_p = 184,84±0,04 °C. O pico 1 da

amostra B ($T_p = 192,10 \pm 0,01$ °C), sugere a mesma decomposição com absorção de $16,35 \pm 1,06$ J.g⁻¹.

O último evento na curva DSC da amostra A, ocorreu em uma $T_p = 217,87 \pm 0,02$ °C no segundo pico endotérmico, sugerindo como caramelização, quebra da ligação glicosídica e fusão das moléculas resultantes da clivagem dos carboidratos com maior grau de polimerização, como FOS e inulina, necessitando absorver $45,41 \pm 2,21$ J.g⁻¹ de energia para o evento ocorrer. No segundo pico da curva DSC da amostra B ($T_p = 220,72 \pm 0,01$ °C), o evento necessitou da absorção de $46,42 \pm 0,51$ J.g⁻¹ de energia para provável decomposição dos açúcares de cadeia maior.

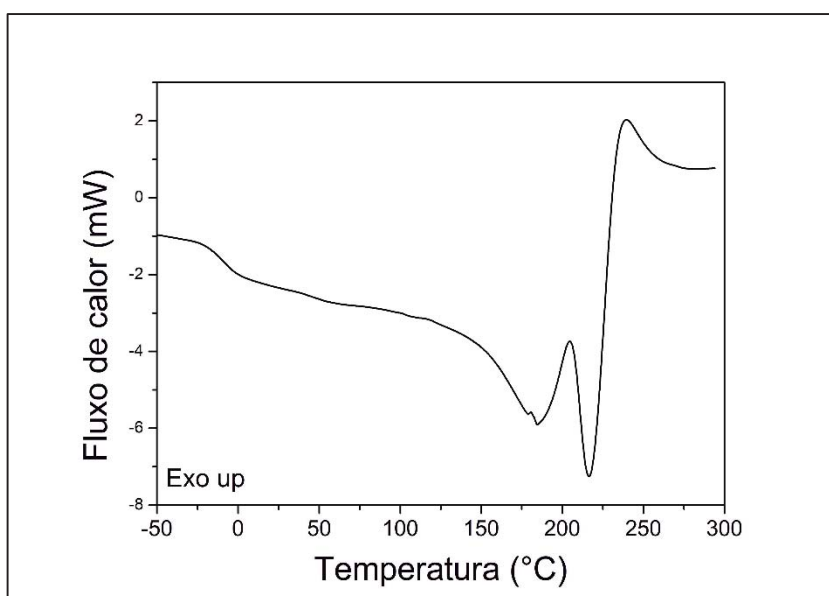


FIGURA 14 – DSC YACON SECO A 45 °C – AMOSTRA A
Fonte: O autor (2014)

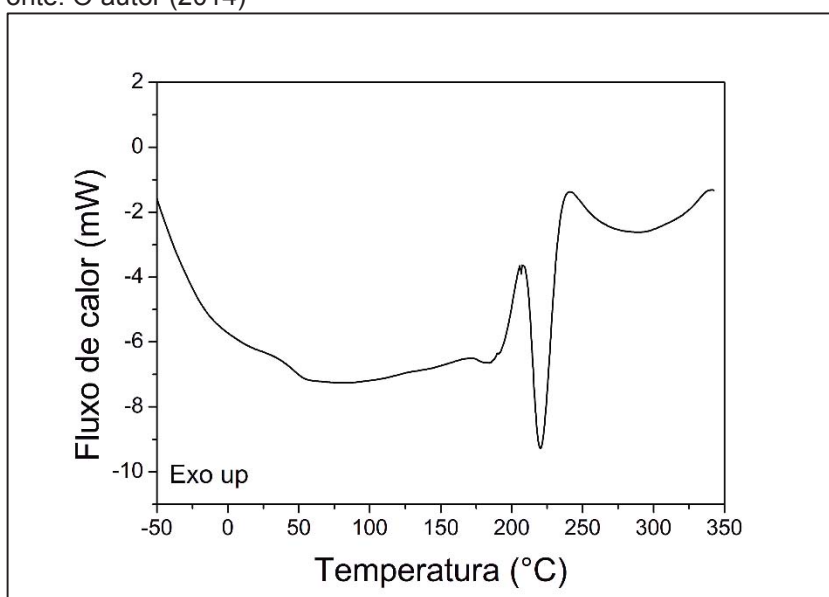


FIGURA 15 – DSC YACON SECO A 70 °C – AMOSTRA B
Fonte: O autor (2014)

As temperaturas de pico encontradas nas curvas DSC das duas amostras, para os Eventos 1 e 2, encontram-se dentro da faixa de temperatura do segundo evento térmico da curva TG-DSC, mostrada na TABELA 2. Portanto, os dois picos que aparecem nas curvas DSC correspondem ao mesmo evento térmico, a segunda perda de massa, das FIGURAS 12 e 13, onde, provavelmente ocorreu reações de decomposição dos açúcares das amostras, como caramelização, quebra da ligação glicosídica e fusão.

A TABELA 4 mostra os valores da temperatura de transição vítrea, o teor de umidade e atividade de água das amostras de yacon secas à 45 °C (A) e 70 °C (B). Os resultados mostraram efeito comum ao observado por LAGO *et al.*, (2012). Os valores de T_p , tiveram o mesmo comportamento que a atividade de água, ou seja não houve diferença significativa entre os dois tratamentos ($p>0,05$) para esses dois dados avaliados.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE REGIÃO DE TRANSIÇÃO VÍTREA DA CURVA DSC, VALORES DE UMIDADE, A_w E TEMPO DE RUPTURA DAS AMOSTRAS A E B

AMOSTRA	T_o (°C)	T_m (°C)	T_c (°C)	UMIDADE (%)	A_w	TEMPO DE RUPTURA (s)
A	38,36 (±0,67)	55,87 (±0,33)	59,44 (±0,51)	10,59 (±0,33)	2,925 (±0,01)	11,81 (±0,27)
B	36,51 (±0,59)	55,26 (±0,23)	64,63 (±1,59)	9,11 (±1,31)	3,563 (±0,07)	1,03 (±0,41)
P-VALOR	0,023	0,059	0,032	0,039	0,089	<0,0001

T_o "onset" temperatura inicial, T_m temperatura média, T_c "endset" temperatura de conclusão, A_w atividade de água, A amostra seca à 45 °C, B amostra seca à 70 °C

FONTE: O autor (2014)

Dentro do intervalo encontrado neste trabalho, estão as temperaturas de transição vítrea determinadas por LAGO *et al.*, (2012) para polpa de yacon desidratada em três temperaturas diferentes (44,74±0,18 °C; 45,14±0,22 °C e 49,82±0,18 °C) e suco de yacon desidratado ($T_g = 48,58±0,24$ °C). Estes autores consideraram como temperatura de transição vítrea, a temperatura média ou de pico. Valores que são inversamente proporcionais aos valores de atividade de água e o autor sugere que quanto maior o conteúdo de água, menor é a T_g . RONKART, *et al.* (2006) também afirma que a atividade de água influencia na T_g e na cristalinidade da inulina, durante o armazenamento, e que o aumento no conteúdo de água diminui a T_g .

Os valores da T_o foram maiores com o aumento da umidade e os valores da T_c aumentaram com a redução da umidade, assim, a faixa de temperatura que compreende o fenômeno de transição vítrea, fica mais estreita na amostra A (FIGURA 16), que possui maior quantidade de umidade, conforme afirma JAY (2005) e ROOS (2010).

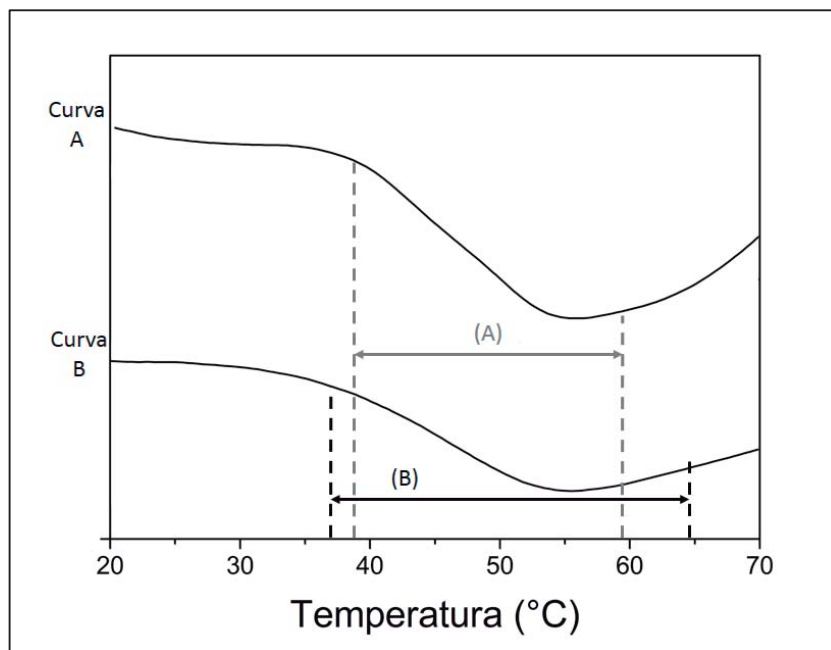


FIGURA 16 – DSC YACON SECO À 45 °C (A) e 70 °C (B) – REGIÃO DE TRANSIÇÃO VÍTREA
Fonte: O autor (2014)

Quando um alimento rico em carboidratos é desidratado à uma temperatura acima da sua temperatura de transição vítrea, pode ocorrer modificações estruturais como colapso ou retração. Alteração na viscosidade, compactação e cristalização são fenômenos relacionados ao colapso que ocorre quando uma matriz já não pode sustentar seu próprio peso, levando à mudanças estruturais, alterando a textura do alimento (LEVINE e SLADE 1986; ROOS, 2010).

A T_g é mudança mais importante, de um sólido vítreo para um estado borrachudo ou gomoso, ou ao contrário de um estado borrachudo para um vítreo. As fatias desidratadas à 70 °C, temperatura que extrapola a região de T_g determinada nesse experimento ($T_c = 64,63$ °C, maior temperatura da região), apresentaram textura diferente das fatias desidratadas à 45°C, medidas pelo tempo de ruptura (s), conforme TABELA 4. A secagem abaixo da temperatura de transição vítrea média proporcionou estado borrachudo (dúctil), enquanto que acima desta temperatura, foi observado característica de sólido vítreo (quebradiço).

O diferença no conteúdo de água das amostras desidratadas também pode explicar a diferença nas características de textura, pois a água age como um plastificante de materiais alimentícios amorfos, e o conteúdo de água define a localização da T_g . Plastificante é definido como um “material incorporado em um polímero para aumentar sua viabilidade, flexibilidade e extensibilidade” (MATVEEVA, GRINBERGA e TOLSTOGUZOV, 2000). A plastificação pela água é típica de carboidratos de baixa massa molecular, oligossacarídeos, polissacarídeos e proteínas, e frequentemente, o estado amorfo é resultado de processos de desidratação (ROOS, 2010). Como o yacon é fonte de inulina e fruto-oligossacarídeos e rico em água (LACHMAN, *et al.* 2003; CAMPOS, *et al.* 2012) sugere-se que ele possui as características necessárias para sofrer influência da transição vítrea no processo de desidratação.

As curvas DSC foram determinadas para os padrões de FOS e inulina (FIGURAS 17 e 18), a fim de compreender os eventos correspondentes às amostras de yacon, já que estas fibras solúveis são os componentes majoritários dessa raiz, excluindo-se a água.

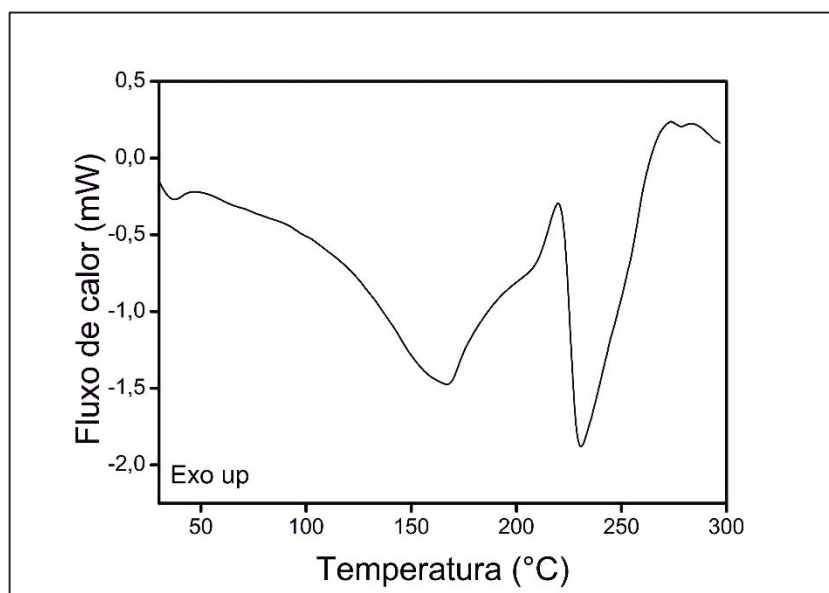


FIGURA 17 – DSC DO PADRÃO DE FOS
Fonte: O autor (2014)

O Pico 1 da curva de FOS (TABELA 5) ocorre em $T_P = 164,52$ °C e, provavelmente representa a decomposição de FOS com baixo peso molecular, assim como no Pico 2 da curva de inulina, onde $T_P = 176,43$ °C.

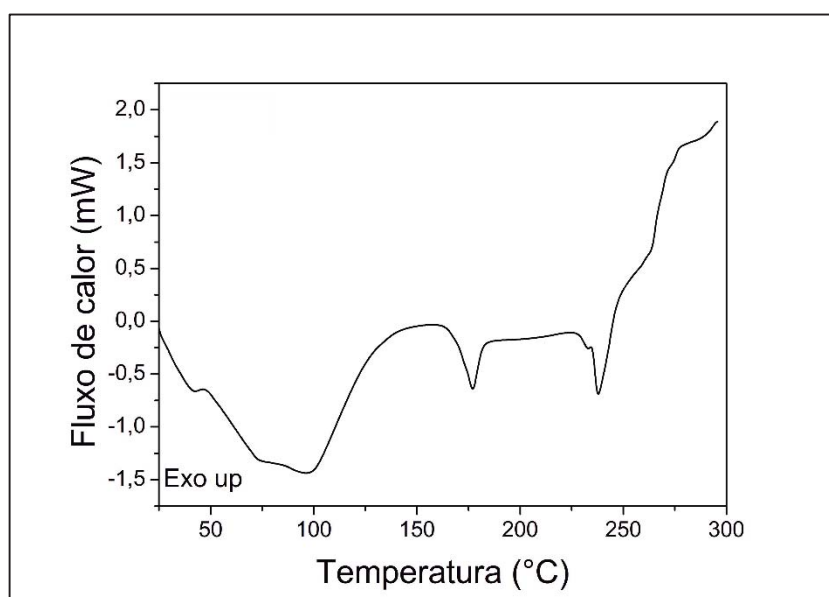
TABELA 5 – RESULTADOS DE DSC PARA PADRÃO DE FOS E INULINA

AMOSTRA	PICO	T ₀ (°C)	T _P (°C)	T _C (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
FOS	1	112,42 (±0,54)	164,52 (±0,01)	169,89 (±0,15)	110,27 (±1,10)
	2	220,86 (±0,01)	233,05 (±0,02)	266,09 (±0,26)	108,07 (±1,02)
INULINA	1	48,71 (±0,01)	97,78 (±0,02)	129,46 (±0,32)	122,87 (±0,81)
	2	168,30 (±0,03)	176,43 (±0,01)	182,45 (±0,03)	11,77 (±0,09)
	3	231,01 (±0,15)	239,10 (±0,02)	247,02 (±0,14)	21,41 (±0,94)

T₀ “onset” temperatura inicial, T_P temperatura de pico, T_C “endset” temperatura de conclusão, ΔH entalpia do fenômeno térmico

FONTE: O autor (2014)

Sugere-se que o Pico 2 da curva de FOS (T_P = 233,05 °C) e os terceiros picos das curvas da amostra A (T_P = 217,87 °C), amostra B (T_P = 220,72 °C) e inulina (T_P = 239, 10 °C) correspondem reações de decomposição dos açúcares das amostras, como caramelização, quebra da ligação glicosídica e fusão (LEONE *et al.*, 2014; CHERIEGATE, 2012).

**FIGURA 18** – DSC DO PADRÃO DE INULINA

Fonte: O autor (2014)

A caramelização dos açúcares, é uma forma de escurecimento não enzimático, que altera a cor e libera compostos voláteis muitas vezes indesejados em alimentos. Portanto, as curvas DSC nos mostram que a secagem do yacon nas temperaturas de 45 °C e 70 °C não provocou decomposição dos carboidratos da

amostra e que o escurecimento da amostra seca à 70 °C não aconteceu devido à reação de caramelização. Como a estrutura molecular dos FOS e inulina é responsável pela funcionalidade e benefícios atribuídos à essas fibras alimentares, é importante que o processamento do alimento não cause danos à esses compostos.

4.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Pela facilidade de fraturar, o yacon desidratado à 70 °C foi selecionado para continuação deste experimento. Os resultados da composição centesimal ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) estão apresentados na TABELA 6, juntamente com valores encontrados por outros autores.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE YACON DESIDRATADO A 70 °C (AMOSTRA B) EXPRESSA EM BASE ÚMIDA E SECA E RESULTADOS DE OUTROS AUTORES.

COMPONENTE	AMOSTRA B		VILHENA E	MOURA	GRAU E REA
	% BASE ÚMIDA	% BASE SECA	CÂMARA (1998)	(2004)	(1997)
ÁGUA	8,64±1,19	-	-	-	-
CARBOIDRATOS	73,01±1,08	79,91	87,18	75,24	79,8 - 85,2
PROTEÍNAS	2,11±0,13	2,31	4,34	3,52	1,3 - 7,3
LIPÍDEOS	0,26±0,07	0,28	1,66	<1,07	0,4 - 1,0
FIBRAS	12,28±0,95	13,44	3,26	16,01	1,1 - 5,7
CINZAS	3,70±0,25	4,05	3,56	4,16	1,1 - 6,7

Fonte: O autor (2014)

Em base seca, a amostra B apresentou 79,91 % de carboidratos, 13,44 % de fibras alimentares, 4,05 % de resíduo mineral, 2,31 % de proteínas e 0,28 % de lipídeos.

Os teores de carboidratos, proteínas, lipídeos e cinzas, da amostra B, estão entre os valores sugeridos por GRAU E REA (1997). Porém, o teor de fibra alimentar está, pelo menos, 2,36 vezes maior que os valores sugeridos, exceto pelo valor encontrado por MOURA (2004). Essa diferença pode ser explicada pela mudança, ao longo dos anos, no conceito de fibra alimentar.

O conceito mais antigo de fibras nos alimentos é o conceito de fibra bruta. Composta de materiais que não são digeríveis pelo organismo humano e são insolúveis em ácido e base diluídos em condições específicas, por exemplo, celulose, lignina e pentosanas (CECCHI, 2003).

A definição de fibra alimentar, ou dietética, também inclui outras substâncias, além dos polímeros, como oligossacarídeos, pectinas e gomas. Os polissacarídeos que não são digeridos no estômago e resistem às enzimas do intestino delgado humano e que podem ser metabolizados por micro-organismos no intestino grosso, se enquadram no grupo das fibras alimentares (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Desta forma, a metodologia de análise mais atual (AOAC, 2011), que considera mais elementos como componentes da fibra alimentar, mostrou valores maiores na análise do teor de fibras da raiz de yacon.

4.4 ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE *Lactobacillus casei* EM YACON DESIDRATADO À 70 °C EM FLOCOS

Os resultados obtidos para a contagem de LC-01 aderidos ao yacon desidratado, para cada tratamento estão na TABELA 7. As variáveis dos tratamentos correspondem: A – 25°C sem trealose; B – 37°C sem trealose; C – 25°C com 0,4 mM de trealose; D – 37°C com 0,4 mM de trealose. A ANOVA comparou se houve diferença significativa entre os tratamentos em cada dia avaliado.

TABELA 7 – MÉDIAS DE LC-01 (LOG UFC.g⁻¹) DURANTE 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO, PARA OS QUATRO TRATAMENTOS

TEMPO DE ARMAZENAMENTO	A	B	C	D	P-VALOR ANOVA
1 dia	9,58 (±0,19) ^a	9,12 (±0,17) ^a	7,83 (±0,99) ^b	6,78 (±0,45) ^c	<0,0001
14 dias	8,51 (±0,30) ^a	8,34 (±0,19) ^a	7,71 (±0,65) ^b	6,87 (±0,15) ^c	<0,0001
28 dias	7,61 (±0,43) ^a	6,80 (±0,48) ^b	6,81 (±0,87) ^b	6,11 (±0,32) ^b	0,003
42 dias	6,53 (±0,95) ^a	6,02 (±0,26) ^a	6,67 (±0,29) ^a	5,30 (±1,01) ^a	0,141
56 dias	5,65 (±0,92) ^a	4,12 (±0,81) ^b	4,55 (±0,76) ^b	4,02 (±0,20) ^b	0,003

^{a,b,c} Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, são estatisticamente iguais à 95% de significância

P < 0,05 indica que as medias diferem entre si

FONTE: O autor (2014)

O teste de Levene indicou que as variâncias dos tratamentos são homogêneas para todos os tempos avaliados ($p > 0,05$). A ANOVA de 1 fator, indicou que os tratamentos são iguais somente no tempo 42 dias ($p = 0,141$), assim, foi aplicado o Teste de Fisher para avaliar a diferença entre as médias dos tratamentos que não mostraram igualdade. A TABELA 7 mostra quais tratamentos diferem entre si em cada tempo avaliado. As médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, são estatisticamente iguais e as seguidas de letras diferentes, diferem entre si, ao nível de 95% de significância.

Ao final do período de armazenamento, 56 dias, o tratamento 1 foi apresentou uma média de $5,65 (\pm 0,9155)$ Log UFC.g⁻¹, maior estatisticamente que as médias dos outros tratamentos avaliados. Portanto, as condições de processo do tratamento 1, incorporação à 25 °C e sem adição de trealose, foram consideradas mais efetivas na incorporação de LC-01 em yacon desidratado em flocos.

O valor de pH foi determinado para todas as amostras em todos os dias de contagem microbiológica (TABELA 8).

TABELA 8 – VARIAÇÃO DO pH ENTRE OS TRATAMENTOS EM CADA TEMPO DE ARMAZENAMENTO

DIA	pH				P-VALOR ANOVA
	A	B	C	D	
1	5,35 ($\pm 0,16$)	5,43 ($\pm 0,08$)	5,51 ($\pm 0,13$)	5,52 ($\pm 0,17$)	0,446
14	5,32 ($\pm 0,10$)	5,40 ($\pm 0,08$)	5,50 ($\pm 0,14$)	5,50 ($\pm 0,20$)	0,576
28	5,37 ($\pm 0,08$)	5,43 ($\pm 0,07$)	5,49 ($\pm 0,14$)	5,48 ($\pm 0,09$)	0,653
42	5,40 ($\pm 0,09$)	5,42 ($\pm 0,09$)	5,31 ($\pm 0,13$)	5,36 ($\pm 0,09$)	0,558
56	5,37 ($\pm 0,13$)	5,42 ($\pm 0,07$)	5,29 ($\pm 0,16$)	5,33 ($\pm 0,06$)	0,564
P-VALOR ANOVA	0,944	0,987	0,181	0,465	

FONTE: O autor (2014)

Não houve diferença significativa entre os valores de pH quando comparou-se os tratamentos entre si, em cada tempo avaliado, bem como, o tempo de armazenamento não teve influência sobre cada tratamento (p -valor $> 0,05$). Então concluiu-se que o número de LC-01 incorporados no yacon não sofreu influência do valor do pH da amostra.

TABELA 9 – MODELO DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS DE LC-01 (LOG UFC.g⁻¹) PARA CADA TRATAMENTO DURANTE O TEMPO DE ARMAZENAMENTO E SEU AJUSTE

TRATAMENTO	CÉLULAS LC-01 (Log UFC.g ⁻¹)						P-VALOR	ANOVA	r ²	EQUAÇÃO DA RETA
	1 DIA	14 DIAS	28 DIAS	42 DIAS	56 DIAS					
A	9,58 (±0,19)	8,51 (±0,30)	7,61 (±0,43)	6,53 (±0,95)	5,65 (±0,92)		< 0,01	0,9981	y = -0,0713x + 9,5874	
B	9,12 (±0,17)	8,34 (±0,19)	6,80 (±0,48)	6,02 (±0,26)	4,12 (±0,81)		< 0,01	0,8700	y = -0,0899x + 9,3988	
C	7,83 (±0,99)	7,71 (±0,65)	6,81 (±0,87)	6,67 (±0,29)	4,55 (±0,76)		< 0,01	0,9845	y = -0,0556x + 8,2293	
D	6,78 (±0,45)	6,87 (±0,15)	6,11 (±0,32)	5,30 (±1,01)	4,02 (±0,20)		< 0,01	0,8779	y = -0,05x + 7,2684	

A – 25°C sem trealose; B – 37°C sem trealose; C – 25°C com 0,4 mM de trealose; D – 37°C com 0,4 mM de trealose.
Fonte: O autor (2014)

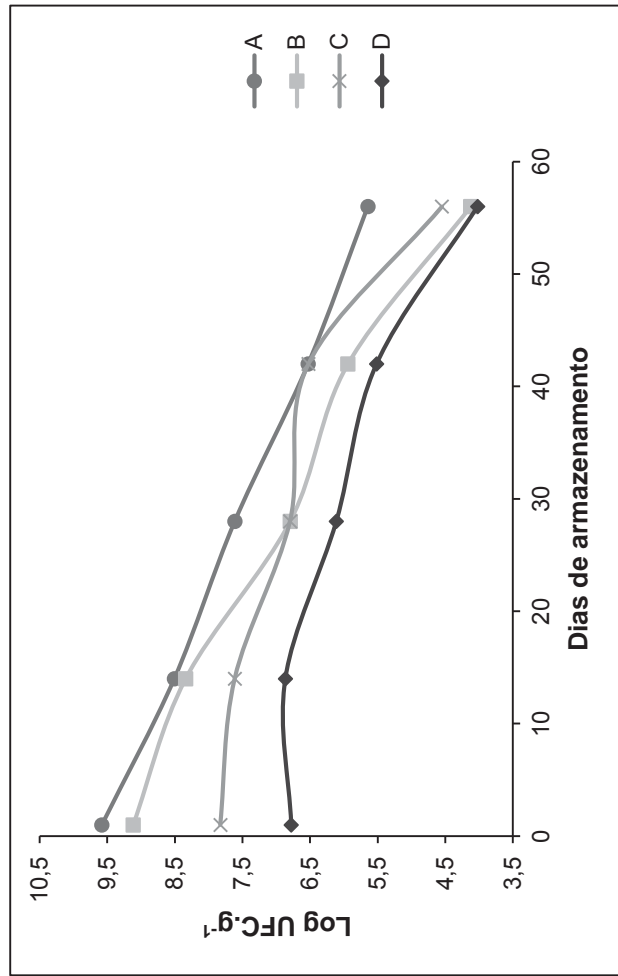


FIGURA 19 – CINÉTICA DE MORTE CELULAR PARA CADA TRATAMENTO

A – 25°C sem trealose; B – 37°C sem trealose; C – 25°C com 0,4 mM de trealose; D – 37°C com 0,4 mM de trealose.
Fonte: O autor (2014)

A cinética de morte celular também foi avaliada, em cada tratamento, durante a evolução do tempo de armazenamento. A FIGURA 19 representa este comportamento e a quantidade média de LC-01 em cada tempo avaliado é apresentada na TABELA 9, juntamente com o coeficiente de determinação (r^2) e a probabilidade da regressão (p-valor).

O efeito geral de diminuir a a_w a um valor abaixo do ótimo (menor que 0,9 para a maioria das bactérias) é aumentar a duração da fase *lag* (estacionária) de crescimento e reduzir a velocidade de crescimento e o tamanho da população final. Esses efeitos são resultantes da influência adversa da baixa quantidade de água sobre as atividades metabólicas, pois todas as reações químicas das células necessitam de um meio aquoso. Adicionalmente ao efeito sobre o metabolismo, uma baixa a_w possui efeito sobre o funcionamento da membrana celular, a qual deve permanecer em estado fluido (JAY, 2005). A população microbiana final de cada tempo avaliado, dos quatro tratamentos, foi sendo reduzida significativamente com o aumento do tempo de armazenamento. Isso pode ser explicado pelas condições estressantes de armazenamento, criada pela baixa atividade de água do yacon desidratado.

Com r^2 superior a 87% podemos dizer que os modelos são preditivos para todos os tratamentos e que o tempo de armazenamento prejudicou a sobrevivência dos LC-01 no yacon desidratado à medida que foi aumentando. Ou seja, no tempo de 1 dia, para o tratamento A, foi encontrada uma média de 9,58 ($\pm 0,19$) Log UFC.g⁻¹ e no tempo 56 de armazenamento essa quantidade baixou para 5,65 ($\pm 0,92$) Log UFC.g⁻¹. A diferença entre as médias foi significativa à 95% para todos os tempos avaliados.

Em geral, a estratégia empregada pelos micro-organismos como proteção contra o estresse osmótico é o acúmulo intracelular de solutos compatíveis. Para isso, as bactérias utilizam, por exemplo, íons K⁺, glutamato, glutamina, prolina, sacarose, trealose e glucosil-glicerol. Todas as células microbianas necessitam da mesma atividade de água interna. As que conseguem crescer em condições extremas de baixa atividade de água, aparentemente o fazem, devido à sua capacidade de concentrar sais, polióis e aminoácidos, em concentrações internas suficientes para evitar a perda de água (JAY, 2005). Os tratamentos C e D, que tiveram trealose adicionada à biomassa durante o processo de incorporação, apresentaram valores menores estatisticamente de contagem microbiana que os tratamentos A e B (sem trealose), conforme observado na TABELA 7 para o primeiro dia após o processo de

incorporação. Este comportamento sugere que, nessas condições de processo, a adição de trealose à biomassa não teve efeito protetor sobre os micro-organismos durante o processo de incorporação dos LC-01 no yacon desidratado.

4.5 SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS DE *Lactobacillus casei* EM CONDIÇÕES GÁSTRICAS SIMULADAS

Os pré-requisitos necessários para o uso comercial dos microrganismos probióticos são a sua sobrevivência, em número suficientemente elevado, durante a produção e estocagem e à passagem pelo trato gastrintestinal superior (ANNAN et al., 2008; KAILASAPATHY; CHIN, 2000; MARTONI et al., 2008). Segundo ROSS *et al.* (2005), condições extremamente ácidas, como as encontradas no estômago, podem diminuir significativamente o número de células probióticas viáveis que chegariam ao intestino.

O processamento de incorporação de LC-01 em yacon desidratado foi repetido nas condições sem trealose à 25 °C (tratamento A) para proceder à avaliação da sobrevivência gástrica *in-vitro*, por que a contagem microbiana, após 56 dias de armazenamento, foi maior para o tratamento A ($5,65 \pm 0,92$ Log UFC.g¹).

A quantidade de células aderidas ao yacon foi determinada para cada tempo de armazenamento, antes que as amostras fossem colocadas em contato com as soluções gástricas. Os resultados estão expressos na FIGURA 20.

O modelo matemático que representa os resultados, com r^2 igual a 94,09%, indica que o tempo de armazenamento prejudicou a sobrevivência dos LC-01 no yacon desidratado à medida que foi aumentando. Ou seja, com um dia de armazenamento foi encontrada uma média de 9,354 ($\pm 0,447$) log UFC.g¹ e após 56 dias essa quantidade baixou para 7,238 ($\pm 0,029$) log UFC.g⁻¹. A influência do tempo de armazenamento sobre a células de LC-01 foi significativa à 95% para todos os tempos avaliados.

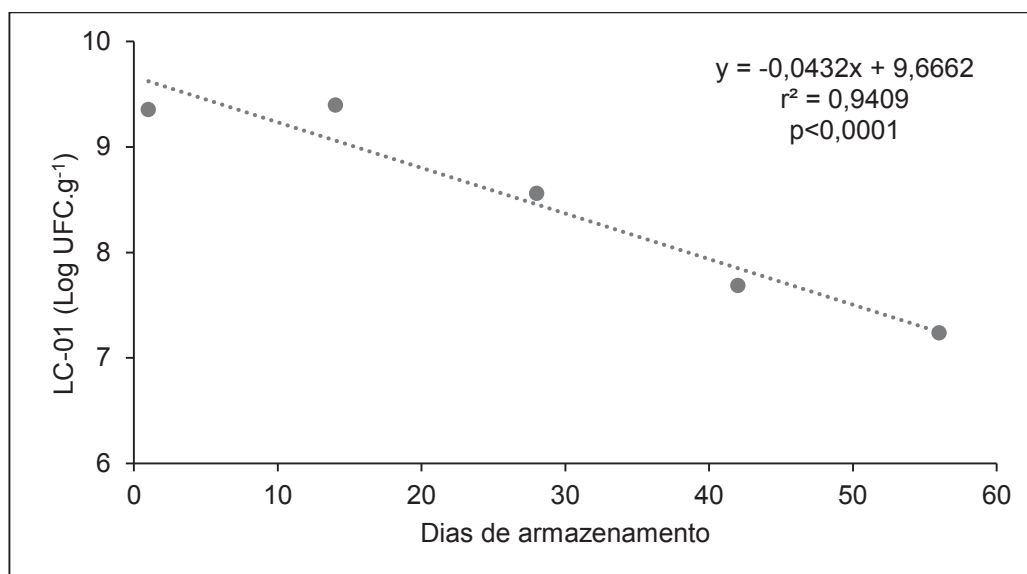


FIGURA 20 – ANÁLISE DE REGRESSÃO DA QUANTIDADE DE LC-01 ADERIDOS EM RELAÇÃO AO TEMPO DE ESTOCAGEM.

Fonte: O autor (2014)

A TABELA 10 apresenta os resultados da sobrevivência desses micro-organismos em condições gástricas simuladas, comparando o número de células na amostra antes e após entrar em contato com a solução de HCl ou de sais biliares.

TABELA 10 - PORCENTAGEM MÉDIA DE SOBREVIVÊNCIA DE LC-01 ADERIDOS AO YACON ÀS CONDIÇÕES GÁSTRICAS SIMULADAS EM SOLUÇÃO DE HCl E EM SOLUÇÃO DE SAIS BILIARES

DIAS	CTL	HCl		SAIS BILIARES	
	log UFC.g ⁻¹	log UFC.g ⁻¹	%	log UFC.g ⁻¹	%
1	9,355 (±0,447)	5,766 (±0,714)	61,63 ^a	7,657 (±0,657)	82,20 ^a
14	9,398 (±0,119)	6,071 (±0,735)	64,59 ^a	9,064 (±0,282)	96,43 ^a
28	8,560 (±0,075)	7,282 (±0,347)	85,07 ^b	7,086 (±0,412)	82,81 ^a
42	7,686 (±0,074)	6,430 (±0,311)	83,66 ^b	7,004 (±0,099)	91,13 ^a
56	7,238 (±0,029)	6,143 (±0,608)	84,87 ^b	6,467 (±0,598)	89,35 ^a
P-ANOVA			<0,0001	0,127	

CTL: contagem total de LC-01; HCl: solução de ácido clorídrico

^{a,b} Médias seguidas da mesma letra são estatisticamente iguais à 95% de significância

FONTE: O autor (2014)

Quando avaliou-se as porcentagens de células sobreviventes nas amostras que foram submetidas às condições simuladas do estômago humano (solução de 0,08 M HCl, com 0,2% NaCl e pH 1,5) observou-se que no início do tempo de armazenamento, até 14 dias, um pouco mais que 60% das células, que se encontravam aderidas no yacon desidratado, sobreviveram às condições adversas

que foram simuladas. Após 28 dias de armazenamento do yacon, as células se mostraram mais resistentes, e mais de 83% que sobreviveram. No yacon avaliado com 1 dia e 14 dias após o processo de incorporação dos micro-organismos, sobreviveram 61,63% e 64,59%, respectivamente, das células de LC-01 que estavam aderidas à superfície do yacon. Estatisticamente, essas duas porcentagens são iguais, conforme observado na TABELA 10. Assim como, para o yacon que ficou armazenado por 28, 42 e 56 dias, 85,07%, 83,66% e 84,87%, respectivamente, o comportamento de sobrevivência das células de LC-01 foram estatisticamente iguais.

Este comportamento sugere que, no início do processo de armazenamento, ou podemos dizer, nos primeiros dias após o processo de incorporação dos micro-organismos, as células têm mais sensibilidade às condições adversas do meio em que se encontram. Em alimentos com baixa atividade de água, como no yacon desidratado, as células precisam criar mecanismos para poder sobreviver à essa condição adversa. Conforme o tempo de armazenamento aumenta, as células se tornam mais adaptadas ao ambiente inóspito, e essa resistência desenvolvida pode ser a explicação para que mais células consigam sobreviver às condições simuladas do estômago humano, quando avaliadas a partir do vigésimo oitavo dia de armazenamento (JAY, 2005).

Quanto à porcentagem de sobrevivência das células nas condições intestinais (solução de sais biliares), os resultados mostraram que não houve diferença significativa do tempo de armazenamento na porcentagem de sobrevivência dos LC-01, sendo que, mais de 80 % das células que chegariam ao intestino delgado, sobreviveriam para colonizar posteriormente, o intestino grosso e atuar como probióticos.

Somente para as amostras armazenadas por 56 dias não houve diferença significativa entre a contagem de células de LC-01 aderidas ao yacon desidratado antes e após a amostra ser colocada em contato com as soluções que simulam as condições do estômago e do intestino humano. A TABELA 11 mostra que a quantidade de células de LC-01 aderidas às amostras armazenadas por 1, 14, 28 ou 42 dias, diminuiu após o contato com as condições gástricas simuladas, tanto para a solução de HCl, quanto para a solução de sais biliares. Mesmo assim, sobreviveram pelo menos cem mil células, em cada grama do alimento, para colonizar o intestino e fornecer ao hospedeiro os benefícios atribuídos aos micro-organismos probióticos.

TABELA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE CÉLULAS DE LC-01 EM YACON DESIDRATADO ANTES E APÓS SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GÁSTRICAS, PARA CADA TEMPO DE ARMAZENAMENTO AVALIADO

DIAS	CTL	HCL		SAIS BILIARES	
	Log UFC.g ⁻¹	Log UFC.g ⁻¹	P-VALOR	Log UFC.g ⁻¹	P-VALOR
1	9,355	5,766	<0,01	7,657	<0,01
14	9,398	6,071	<0,01	9,064	<0,01
28	8,560	7,282	<0,01	7,086	<0,01
42	7,686	6,430	<0,01	7,004	<0,01
56	7,238	6,143	0,090	6,467	0,154

Antes da simulação gástrica: CTL; após a simulação gástrica: HCl e Sais Biliares.

Valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa a 95% entre as médias.

FONTE: O autor (2014)

Em uma situação real, o alimento ingerido passa pelo estômago e depois pelo intestino, ou seja, primeiramente, entra em contato com a solução de HCl e, em seguida, com a solução de sais biliares. Pelas técnicas que foram utilizadas para simular as condições gástricas, não foi possível avaliar a mesma amostra nas duas soluções, como ocorreria em uma situação de ingestão do alimento. Assim, a TABELA 12 contém os dados extrapolados para simular esta condição real, para o consumo diário de 30 g, porção recomendada pela RDC 359 da ANVISA (BRASIL, 2003).

TABELA 12 – EXTRAPOLAÇÃO DOS DADOS PARA SIMULAR A QUANTIDADE SOBREVIVENTE DE CÉLULAS DE LC-01 EM SITUAÇÃO DE INGESTÃO DE 30 g DE YACON DESIDRATADO COM *L. casei*

DIAS	CLT	%	HCl	%	SAIS BILIARES
	Log UFC.30g ⁻¹	SOBREVIVÊNCIA HCL	Log UFC.30g ⁻¹	SOBREVIVÊNCIA SAIS BILIARES	Log UFC.30g ⁻¹
1	10,95	61,63	6,75	82,20	5,55
14	10,89	64,59	7,03	96,43	6,78
28	10,04	85,07	8,54	82,81	7,07
42	9,17	83,66	7,67	91,13	6,99
56	8,72	84,87	7,40	89,36	6,61

Modelos: HCl = (CTL) x (% sobrevivência HCl); Sais biliares = (HCl) x (% sobrevivência sais biliares)

FONTE: O autor (2014)

Desta forma, a TABELA 13 nos diz que 30 g do yacon com LC-01, que está armazenado há 56 dias, possui mais que 1.10^8 UFC (8,72 Log UFC). Portanto, se for ingerido, 1.10^7 UFC (7,07 Log UFC) chegarão viáveis ao intestino grosso para colonizar e promover os benefícios atribuídos à esses probióticos. De acordo com a FAO / WHO (2001) o processo estudado garante a exigência mínima de 10^6 a 10^8

UFC.g⁻¹ na porção diária recomenda, para que haja colonização bem sucedida do cólon e poderia ser classificado como alimento probiótico.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de microscopia eletrônica permitiram observar a aderência das células de LC-01 na superfície do yacon desidratado. A FIGURA 21 representa a imagem, aumentada 5.000 vezes, de um floco de yacon desidratado à 70 °C, antes do processo de incorporação das bactérias. Essa imagem serve de comparação para podermos identificar mais facilmente as células de LC, que possuem tamanho de 0,5-1,5 µm e formato de bacilo.

Após o processo de incorporação, imagens foram feitas nos tempos 1 à 56 dias (FIGURAS 22-26).

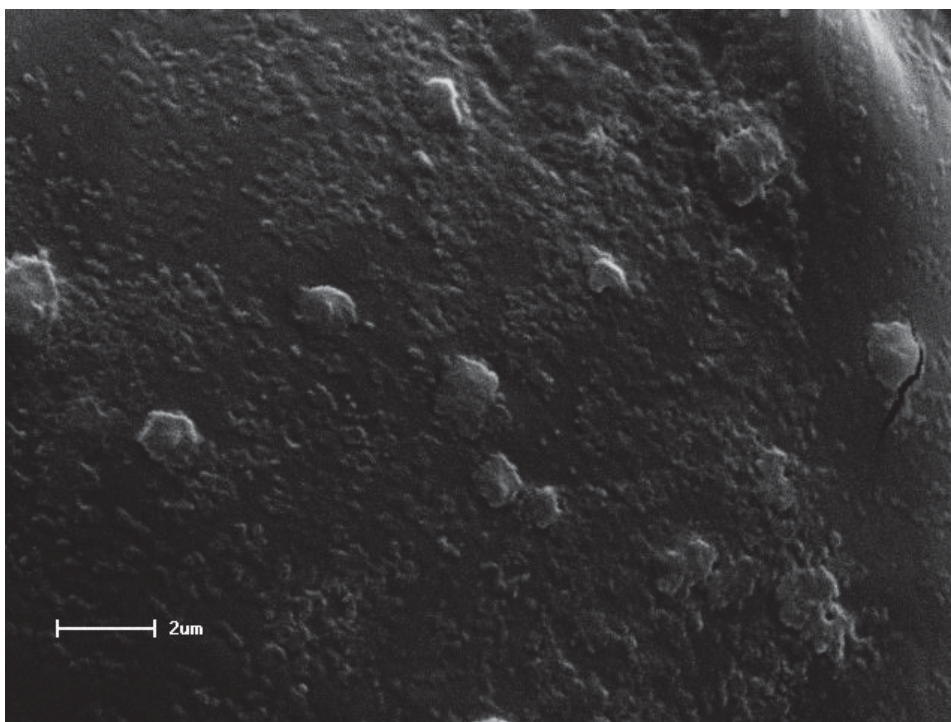


FIGURA 21 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS ANTES DA ADIÇÃO DE *L. CASEI* COM AUMENTO DE 5.000 VEZES.
Fonte: O autor (2014)

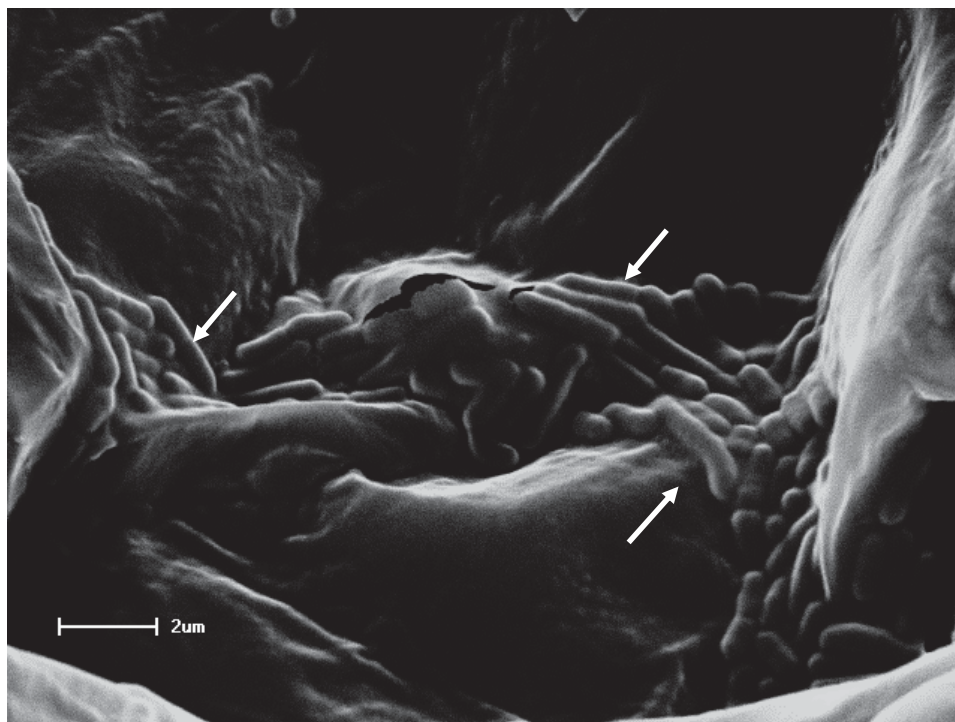


FIGURA 22 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE *L. casei*, NO 1º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 5.000 VEZES.
Setas: células de *L. casei*.
Fonte: O autor (2014)

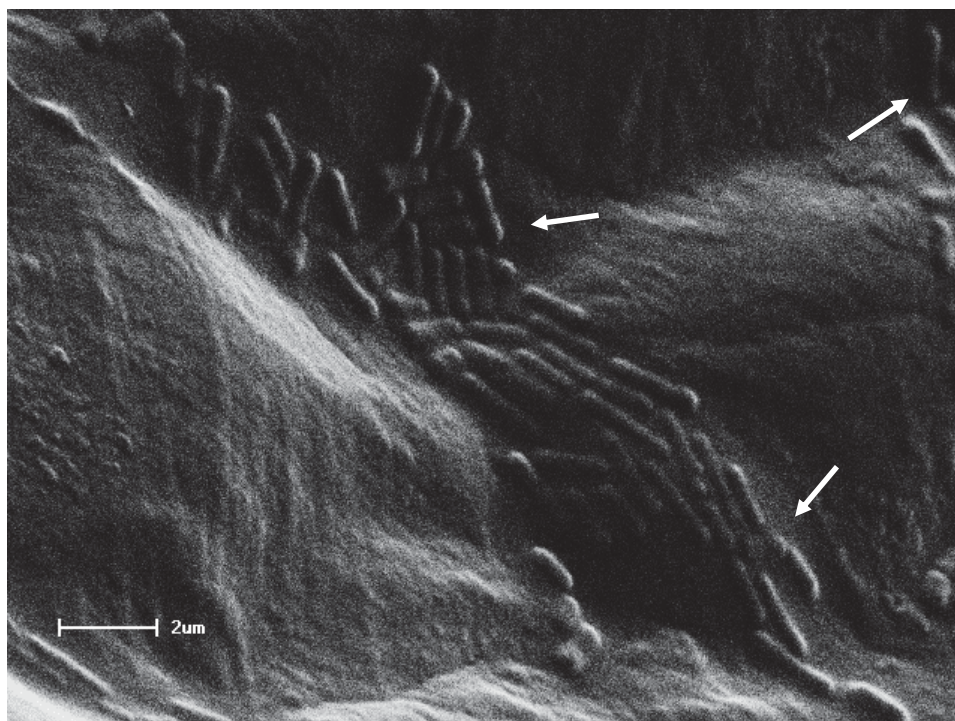


FIGURA 23 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE *L. casei*, NO 14º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 5.000 VEZES.
Setas: células de *L. casei*.
Fonte: O autor (2014)

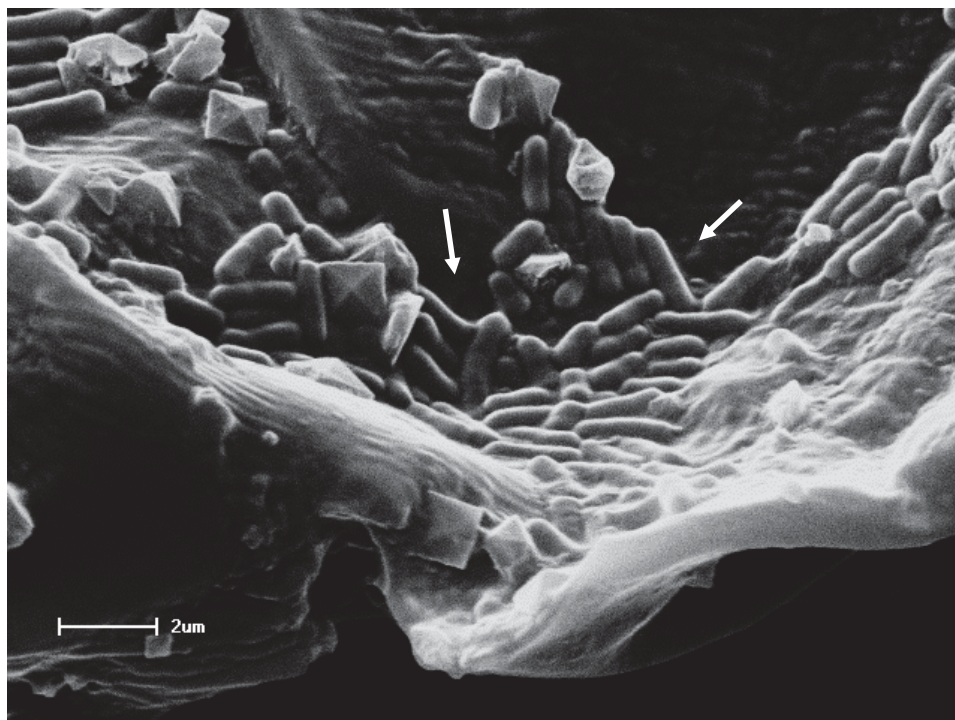


FIGURA 24 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE *L. casei*, NO 28º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 5.000 VÉZES.
Setas: células de *L. casei*.
Fonte: O autor (2014)

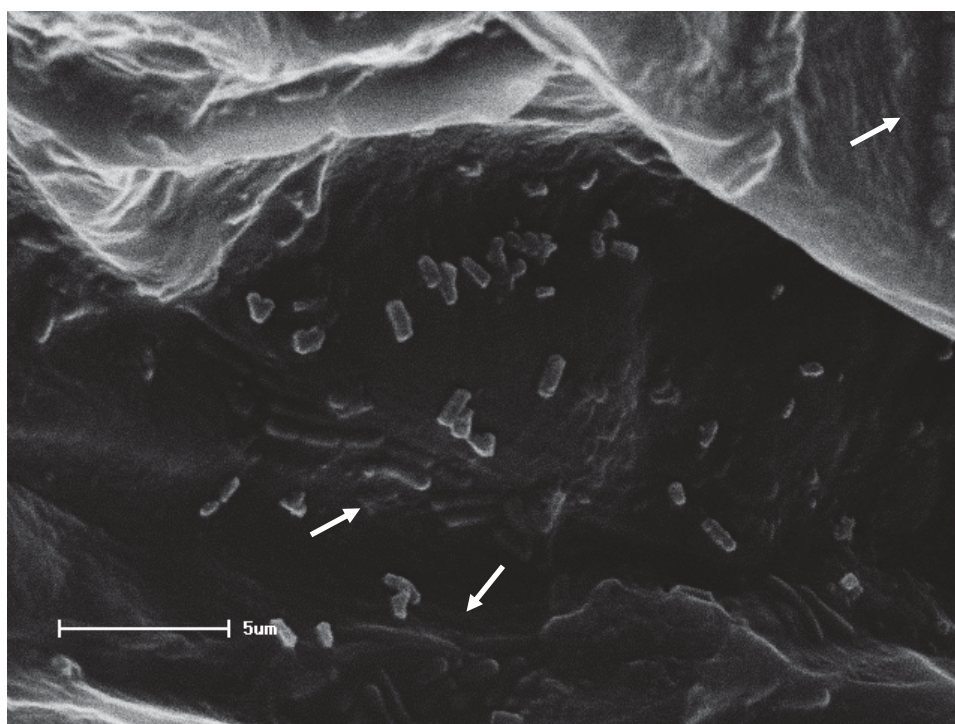


FIGURA 25 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE *L. casei*, NO 42º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 3.500 VÉZES.
Setas: células de *L. casei*.
Fonte: O autor (2014)

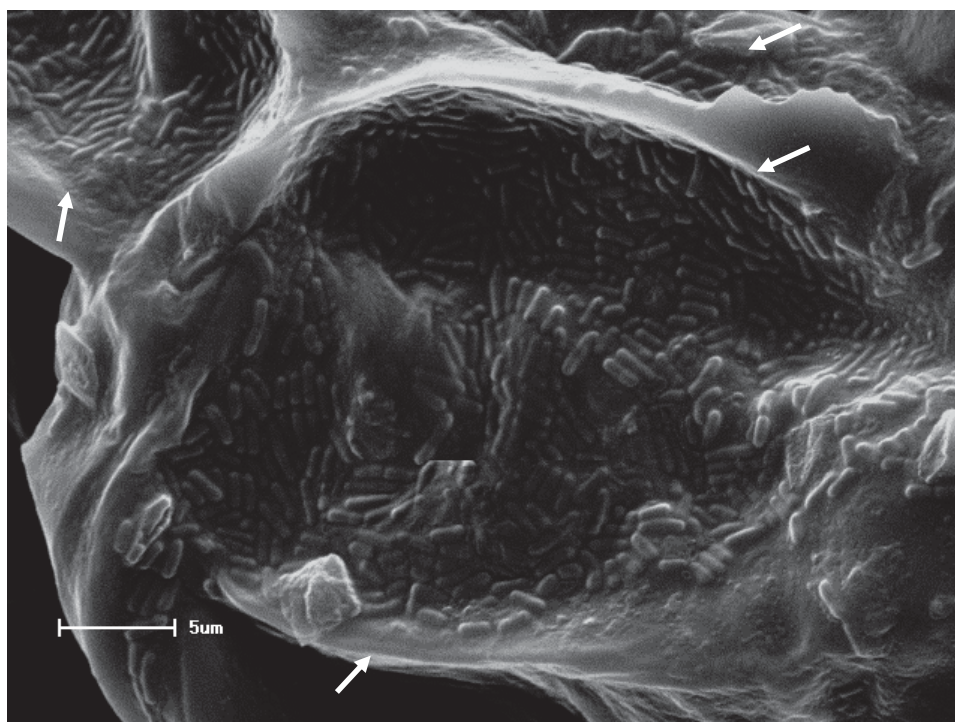


FIGURA 26 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO YACON DESIDRATADO EM FLOCOS APÓS A ADIÇÃO DE *L. casei*, NO 56º DIA DE ARMAZENAMENTO, COM AUMENTO DE 2.400 VÊZES.

Setas: células de *L. casei*.

Fonte: O autor (2014)

As células aderiram preferencialmente em cavidades naturais da estrutura da superfície, irregularidades comuns em vegetais desidratados (BERNESTEIN, NOREÑA, 2012).

Na FIGURA 25 é possível observar algumas células danificadas (tamanho menor), possivelmente pelo processo de secagem ou pelas condições adversas criadas pelo ambiente durante o armazenamento. Nas imagens obtidas, não foi observada produção de exopolissacarídeo (EPS). Apesar de não terem sido quantificados, é comum, em meio estressante, bactérias produzirem EPS como mecanismo de defesa (GUERGOLETTO, *et al.* 2010).

5 CONCLUSÕES

As fatias de yacon desidratadas à 45 °C (amostra A) apresentaram textura gomosa enquanto que as fatias desidratadas à 70 °C (amostra B) apresentaram textura crocante.

O aumento da temperatura de secagem (de 45 °C para 70 °C) provocou mudanças na coloração da fatia de yacon, que apresentou coloração mais avermelhada e escura.

A temperatura de secagem não teve influência sobre a atividade de água do yacon desidratado, porém foi inversamente proporcional ao conteúdo de umidade, ou seja, menor temperatura de secagem resultou em maior conteúdo de umidade.

A técnica de DSC permitiu observar a faixa de temperatura de transição vítrea (T_g) do yacon. A T_g foi reduzida em 10,04 °C, com a redução da temperatura de secagem, redução atribuída ao maior conteúdo de umidade da amostra A. A característica crocante do yacon desidratado à 70 °C pode ter relação com a temperatura de secagem aplicada, acima da T_g , permitindo que este fenômeno acontecesse

As curvas de TG-DSC mostraram 4 etapas de perda de massa: desidratação, reações simultâneas, como caramelização e fusão dos açúcares, decomposição e oxidação da matéria orgânica, e os eventos térmicos da amostra A ocorreram em diferentes temperaturas que da amostra B, porém localizadas na mesma região.

A temperatura de secagem de 70 °C não é suficientemente alta para causar reações de degradação dos prebióticos (FOS e inulina) naturalmente presentes no yacon, pois estas reações se iniciam perto de 100 °C com a desidratação da amostra.

LC-1 incorporados no processo A (1h e sem trealose) foi mais adequado em número maior de células sobreviventes. Nessas condições, as bactérias sobreviveram em maior quantidade ao final dos 56 dias avaliados ($4,46 \times 10^5$ UFC.g⁻¹). Assim, podemos concluir que, para esse processo, a trealose não teve efeito protetor na sobrevivência das células durante o processo de incorporação.

Cerca de 75 % das células presentes no yacon (processo A) sobreviveram às condições gástricas simuladas mostrando que os *Lactobacillus casei* podem ter ação probiótica e a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitou a visualização das células na superfície do yacon, confirmando sua aderência

Para efeito probiótico do produto estudado, a quantidade diária ingerida deve ser de 30 g de yacon com LC-1, até 56 dias após sua produção ($9,24 \text{ Log UFC} \cdot 30\text{g}^{-1}$)

Estudos futuros podem abordar a análise da sobrevivência dos LC-01 no yacon desidratado por maior tempo de armazenamento, já que produtos desidratados, normalmente, têm durabilidade maior que 56 dias. Aplicação de outras técnicas como espectrometria de infra vermelho por transformada de Fourier (IRFT) e difração de raios-x proporcionam melhores condições para discutir os resultados obtidos por termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

REFERÊNCIAS

- ALBERTON, C. *et al.* Thermal analysis, rheology, x-ray diffractometry and atomic force microscopy in the evaluation of binary mixtures of starch-hydrocolloids. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. v. 3, p. 305-309, 2014.
- ALLES, M. S. *et al.* Fate of fructo-oligosaccharides in the human intestine. **British Journal of Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 211–221, 1996.
- ALTAY, F.; GUNASEKARAN, S. Influence of drying temperature, water content, and heating rate on gelatinization of corn starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 4235-4245, 2006.
- ANDRADE, M. M. P. *et al.* Effects of heat moisture treatment on organic cassava starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 115, p. 2115-2122, 2014.
- ANNAN, N.T. *et al.* Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.41, p.184-193, 2008.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Arlington, 1995.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, **Official Methods of Analysis**, n. **925.10**, Washington D.C., 1997.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. n. **985.29**, Gaithersburg, 2011.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2004.
- BALDISSERA, A.C. *et al.* Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 73, p.1497-1512, 2011.
- BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HERNRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2007.
- BERNSTEIN, A.; NOREÑA, C.P.Z. Study of Thermodynamic, Structural, and Quality Properties of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) During Drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 148-160, 2014.
- BHANDARI, B.R.; HOWES, T. Implication of glass transition for the drying stability of dried foods. **Journal of Food Engineering**, v. 40, p. 71-79, 1999.
- BIELECKA, M. *et al.* Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. **Food Research International**, v. 35, p. 139–144, 2002.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. **Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 26 de dezembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Técnico-científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. 2014. VIII – Lista das Alegações Aprovadas. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wuE>>. Acesso em: 15/03/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Guia Alimentar para a População Brasileira 2005** – Promovendo a Alimentação Saudável. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/05_1109_M.pdf>. Acesso em: 15/03/2014.

BURITI, F.C.A., SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373–380, 2007.

CALDERÓN O. *et al.* Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 1, p. 51-56, 2007.

CANO P.G.; PERDIGÓN G. Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 4, p. 433-440, 2003.

CAMPOS, D. *et al.* Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, p.1592–1599, 2012.

CECCHI, H.M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. Ed. UNICAMP, 207p. 2003.

CELESTINO, S.M.C. **Princípios de secagem de alimentos** – Documentos 276, Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2010.

CHARALAMPOPOULOS, D., RASTALL, R.A. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 187–191, 2012.

CHERIEGATE, A.P.S.C. **Análise microestrutural de polpa de amora-preta co-cristalizada com sacarose**. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

COEURET V.; GUEGUEN M., VERNOUX J.P. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 71 n. 4, p. 451-460, 2004.

COLMAN, T.A.D. **Caracterização térmica, reológica e estrutural de amidos de mandioca nativo, ácido-modificado e oxidado expostos à radiação de micro-ondas**. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

COUSSEMENT, P.A.A. Inulin and oligofructose: Safe intakes and legal status. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1412–1417, 1999.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 245–253, 2002.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**, 4 ed. Artmed, 900p., 2010.

DELGADO, G.T.C. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, p. 222-228, 2013.

DIPLOCK, A.T. *et al.* Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. S1-S27, 1999.

DJOUZI, Z. *et al.* The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 11, p. 2260-2266, 1997.

DRAGO, L. *et al.* Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new Lactobacillus isolates of human intestinal origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 455–463, 1997.

DUANGMAL, K.; SAICHEUA, B.; SUEEPRASAN, S. Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1437-1445, 2008.

FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations. **FAO in action**.
Página inicial. Disponível em:
<<http://www.fao.org/GIII/english/newsroom/action/index.html>>. Acesso em:
13/03/2014.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations / World Health Organization. **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001.** Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf?ua=1> Acesso em: 13/03/2014.

FELLOWS, P. **Food Processing Technology** – Principles and Practice, Second Edition, CRC Press LLC, USA, 2000.

FLAMM, G. *et al.* Inulin and oligofructose as dietary fiber: A review of the evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, p. 353-362, 2001.

FORESTIER, C. *et al.* Probiotic activities of *Lactobacillus casei* rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 2, p. 167-173, 2001.

GENTA, S., *et al.* Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. **Clinical Nutrition** 28, 182–187, 2009.

GEYER, M., *et al.* Effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on colonic transit time in healthy volunteers. **Digestion**, v. 78, p. 30–33, 2008.

GIBSON, G. R. e ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introduction the concept of prebiotics. **American Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GIBSON, G. R. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, 17, 259–275, 2004.

GIBSON, G.R.; OTTAWAY, D.R.; e RASTALL, R.A. **Prebiotics: new developments in functional foods.** Oxford: Chandos Publishing Limited, 108 p., 2000.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GRAEFEE, S., *et al.* Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**, v. 86, p. 157–165, 2004.

GRANATO, D.; CALADO, V.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

GRAU, A.; REA, J. **Yacon. *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson.** In: HERMANN, M.; HELLER, J. Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: IPK, Gatersleben / IPGRI, p. 199-242, 1997.

GUERGOLETTI, K.B. *et al.* Survival of *Lactobacillus casei* (LC-01) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 415–421, 2010.

GUÉRIN-DANAN, C. *et al.* Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. **Journal of Nutrition**, v. 131, v. 1, p. 111-117, 2001.

HABIB, N.C. *et al.* Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. **Chemico-Biological Interaction**, v. 194, p. 31-39, 2011.

HENRIQUES, F.; GUINÉ, R.P.F.; BARROCA, M.J. Influence of drying treatment on physical properties of pumpkin. Croat. **Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**, v. 7, p. 53-58, 2012.

HEYNS, K., STUTE, R. e PAULSEN, H. Brfiunungsreaktionen und Fragmentierung von Kohlenhydraten. **Carbohydrate Research**, v.2, p.132-138, 1966.

HOLZAPFEL, W.H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365S-373S, 2001.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

HONORÉ, S.M. *et al.* Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1704–1715, 2012.

HORI, T. *et al.* Argumentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 105-108, 2002.

HUDAULT, S. *et al.* Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 513-518, 1997.

HURTTA, M.; PITKÄNEN, I.; KNUUTINEN, J. Melting behavior of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. **Journal of Carbohydrate Research**, v.339, n.13, p. 2267-2273, 2004.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial**, 1. ed. São Paulo: Giz, 2012.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technology**, v. 46, p. 126-135, 1993.

ISOLAURI, E. *et al.* Probiotics: effects on immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 444s–450s, 2001.

ITSARANUWAT, P.; SHAL-HADDAD, K.; ROBINSON, R.K. The potential therapeutic benefits of consuming ‘health-promoting’ fermented dairy products: a brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.

JAHREIS, G. *et al.* Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. **Food Res.Int.**, v. 35, p. 133–138, 2002.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 6, 2009.

KELESIDIS, T. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 5, n. 2, p. 111-125, 2012.

KLINDER, A. *et al.* Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. **Nutrition and Cancer**, v. 49, p. 144–155, 2004.

KOH, J.H. *et al.* Symbiotic impact of tagatose on viability of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG mediate by the phosphotransferase system (PTS). **Food Microbiology**, v. 36, p. 88-13, 2013.

KOTOVICZ, V. *et al.* Influence of process conditions on the kinetics of the osmotic dehydration of yacon (*Polymnia sonchifolia*) in fructose solution. **Journal of Food Processing and Preservation**, No prelo, 2013.

KOURKOUTAS, Y. *et al.* *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 411-416, 2005.

KRAMER, A.; TWIGG, B.A. **Fundamentals of quality control for the food industry**. West Port, CT: AVI Publishing Co. p. 512. 1962.

KROH, L.W. Caramelisation in food and beverages. **Food Chemistry**, v.51. p.373-379, 1994.

KWAK, N.S.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 99-107, 2001.

LACHMAN, J.; FERNÁNDEZ, E.C.; ORSÁK, M. Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use – a review. **Plant, Soil, and Environment**, v. 49, p. 283-290, 2003.

LAGO, C.C. *et al.* Characterization of powdered yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice and pulp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2183-2191, 2012.

LAJOLO, F. M. Functional foods: Latin American perspectives. **British Journal of Nutrition**. V. 88, n. 2, p. S145-S150, 2002.

LE MESTE, M. *et al.* Glass transition and food technology: a critical appraisal. **Journal of Food Science**., v. 67, n. 7, p. 2444–2458, 2002.

LEÃO, A.C.; SOUZA, L.A.C.; ARAÚJO, A.A. Gerenciamento de cores – ferramenta fundamental para a documentação digital de bens culturais. **Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação**, v.1, n.4, p. 215 – 220, 2007.

LEE, J.W.; THOMAS, L.C.; JERRELL, J.; FENG, H.; CADWALLADER, K.R.; SCHMIDT, S. Investigation of thermal decomposition as the kinetic process that causes the loss of crystalline structure in sucrose using a chemical analysis approach (Part II). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.702- 712, 2011.

LEE, K.Y.; HEO, T.R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

LEONE, *et al.* Evolved gas analysis (coupled TG-DSC-FTIR) applied to the thermal behaviour of inulin. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. No prelo, 2014.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LEVINE, H.; SLADE, L. Glass transitions in foods. In: SCHWARTZBERG, H.G.; HARTEL, R.W. **Physical chemistry of Foods**. 1 ed. New York: Marcel Dekker, p. 83-221, 1992.

LEVINE, H.; SLADE, L.A. Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products (SHPs). **Carbohydrate Polymers**, v. 6, p. 213-244, 1986.

LIU, C.T. *et al.* Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 721, n. 2, p. 157-162, 2011.

LOBO, A.R. *et al.* Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 776–785, 2007.

LUYTEN, H.; PLIJTER, J.J.; VLIET, T.V. Crisp/Crunchy crusts of cellular foods: a literature review with discussion. **Journal of Texture Studies**, v. 35, n. 5, p. 445–492, 2004.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 701–714, 2006.

MANNING, T. S., e GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 18(2), p. 287–298, 2004.

MARTEAU, P.R. *et al.* Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 430s–436s, 2001.

MARTONI, C. *et al.* Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 225–233, 2008.

MATTIA, A.; MERKER, R. Regulation of Probiotic Substances as Ingredients in Foods: Premarket Approval or “Generally Recognized as Safe” Notification. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. S115-S118, 2008.

MATVEEV, Y.I.; GRINBERG, V.Ya.; TOLSTOGUZOV, V.B. The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 425–437, 2000.

MATVEEVA, Y.I.; GRINBERGA, V.Y., TOLSTOGUZOV, V.B. The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 425–437, 2000.

MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 7, p. 611-618, 2004.

MERCK & Co. INC. **The Merck Index**. 11th. Ed., Rohway Ed., New York, 1989.

MORAES, F.P; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORRIS, C.; MORRIS, G.A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, p. 237–248, 2012.

MOURA, C.P. **Aplicação de redes neuronais para a predição e otimização do processo de secagem de yacon (*Polymnia sonchifolia*) com pré-tratamento osmótico**. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MOURA, N. A., *et al.* Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2902-2910, 2012.

MUSSATTO, S.I., MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007.

NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: What are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402S–1406S, 1999.

NISHINARI, K. Texture and rheology in food and health. **Food Science and Technology Research**, v. 15, n. 2, p. 99-106, 2009.

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

OLIVEIRA, C.S. *et al.* Thermal, structural and rheological behaviour of modified waxy corn starch with hydrochloric acid at different temperatures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, p. 13-18, 2014.

OLIVEIRA, R.B. *et al.* Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 434–441, 2011.

OUWEHAND, A.C. *et al.* Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

PADILHA, V.M. *et al.* Tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2178-2184, 2009.

PERUSSELLO, C.A. *et al.* Assessment of the osmo-convective dehydration on the quality attributes and centesimal composition of yacon (*S. sonchifolius*). **Boletim CEPPA**, v. 31, n. 1, p.25-38, 2013.

PIMENTEL, T.C. Atitude do consumidor em relação a culturas probióticas e alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, 2012.

PIMENTEL, M.B.V.C. de, FRANCKI, M.V., GOLLÜCKE, B.P.A. **Alimentos funcionais. Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo, 2005.

QUINTAS, M., *et al.* Multiresponse modelling of the caramelisation reaction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.306–315, 2007.

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M. Avaliação Objetiva da Cor. In: **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Cap.7, ed. UFV, Viçosa-MG, p. 287-370, 2007.

REIS, F.R.; LENZI, M.K.; MASSON, M.L. Effect of vacuum drying conditions on the quality of yacon (*Salamanthus sonchifolius*) slices: process optimization toward color quality. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 67-73, 2012.

ROBERFROID, M. B. Caloric value of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1436S–1437S, 1999.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 461–480, 2000.

ROBERFROID, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 6, p. 1660S-1665S, 2000.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, v. 2, p. S105–S110, 2002.

ROOS, Y.H. Characterization of food polymers using state diagrams. **Journal of Food Engineering**, v. 24, n. 3, p. 339-360, 1995.

ROOS, Y.H. Glass transition temperature and its relevance in food processing. **Annual Review in Food Science and Technology**, v. 1, p. 469–496, 2010.

RONKART S. *et al.* Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 210–217, 2006.

ROSS, R.P. *et al.* Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1410–1417, 2005.

RUSSELL, J.B. **Química Geral**. Ed. Mc Graw Hill Book Company, 897 p. 1981.

SAARELA, M., Gut bacteria and health foods – the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 99–117, 2002.

SAARELA, M. *et al.* Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, 112(2), 171–178, 2006.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 563–572, 1998.

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

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Effect of carbohydrates on survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 271–276, 2006.

SANTOSA, S., FARNWORTH, E.; JONES, P.J.H. Probiotics and Their Potential Health Claims. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 6, p. 265-274, 2006.

SANZ, M. L., *et al.* Influence of glycosidic linkages and molecular weight on the fermentation of maltose-based oligosaccharides by human gut bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9779–9784, 2006.

SCHANDA, J. **Colorimetry: Understanding the CIE System. 2007.** Disponível em: <http://books.google.com.br/books/about/Colorimetry.html?id=uZadszSGe9MC&redir_esc=y>. Acesso em: 11/03/2014.

SCHER, C.F.; RIOS, A.O.; NOREÑA, C.B.Z. Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, n.11, p.2169-2175, 2009.

SCHWENNINGER, S.M. *et al.* Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 111-119, 2005.

SHI, Q.; ZHENG, Y.; ZHAO, Y. Mathematical modeling on thin-layer heat pump drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) slices. **Energy Conversion and Management**, v.71, p.208–216, 2013.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, n. 12, p. 411-417, 1999.

SIRÓ, I. *et al.* Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite**, v. 51, n.3, p. 456-467, 2008.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

STRINGHETA, P. C. *et al.* **Alimentos “Funcionais”**: conceitos, contextualização e regulamentação. Ed. Templo, 246p., 2007.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 2, p. 143-149, 2004.

TARAPORE, R.S., SIDDIQUI, I.A., MUKHTAR, H. Modulation of Wnt/b-catenin signaling pathway by bioactive food components. **Carcinogenesis**, 33, 483–491, 2012.

TONELI, J.T.C.L. *et al.* Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 122–131, 2008.

USA. Food and Drug Administration. FDA. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso: 13/03/2014.

VALENTOVÁ, K. *et al.* The biological and chemical variability of yacon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1347-1352, 2006.

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

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. Ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1219p. 1992.

VILHENA, S.M.C.; CÂMARA, F.L.A. **Uses and cultivation of “yacon” (*Polymnia sonchifolia* Poep Endl.) in Brasil**. In: International Congress, New Crops And New Uses: Biodiversity And Agricultural Sustainability. Phoenix, Arizona, USA, p. 103, 1998.

VILLEGAS, B.; COSTELL E. Flow behavior of inulin-milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 776-781, 2007.

WHO. World Health Organization. **Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health: Fifty-seventh world health assembly Wha 57.17. 2004**. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_english_web.pdf>. Acesso: 13/03/2014.

WHO. World Health Organization. **Macroeconomics and Health: Investing in Health for Economic Development. Geneva. 213p. 2001**. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2001/924154550x.pdf>>. Acesso: 13/03/2014.

WOUTERS, R. **Inulin**. In: Food stabilisers, thickeners and gelling agents. New York: John Wiley & Sons, p. 180-197, 2010.