

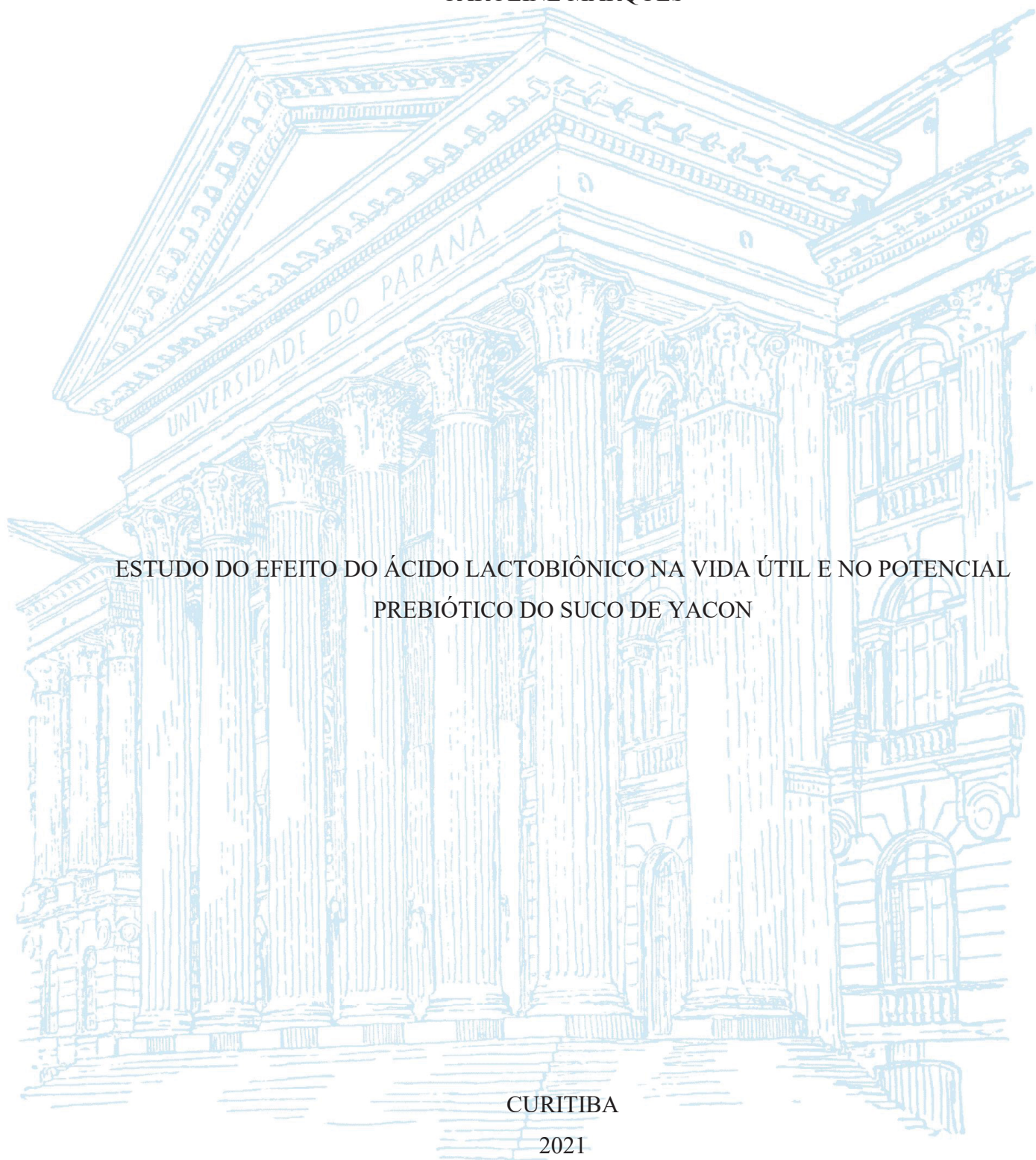
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE MARQUES

ESTUDO DO EFEITO DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO NA VIDA ÚTIL E NO POTENCIAL
PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON

CURITIBA

2021



CAROLINE MARQUES

ESTUDO DO EFEITO DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO NA VIDA ÚTIL E NO POTENCIAL
PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON

Defesa de Doutorado 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 Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Lúcia Masson
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Marina Leite Mitterer-Daltoé

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

M357e Marques, Caroline

Estudo do efeito do ácido lactobiônico na vida útil e no potencial prebiótico do suco de yacon [recurso eletrônico] / Caroline Marques – Curitiba, 2021.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa . Dra. Maria Lúcia Masson

Coorientadora: Profa . Dra. Marina Leite Mitterer-Daltoé

1. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). 2. Sucos vegetais. 3. Prebióticos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Masson, Maria Lúcia. III. Mitterer-Daltoé, Marina Leite. IV. Título.

CDD: 663.63

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-RETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 400C1016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINE MARQUES** intitulada: **ESTUDO DO EFEITO DO ÁCIDO LACTOBÍOTICO NA VIDA ÚTIL E NO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON**, sob orientação da Profa. Dra. **MARIA LUCIA MASSON**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Outubro de 2021

Assinatura Eletrônica

16/11/2021 14:24:37.0

MARIA LUCIA MASSON

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/11/2021 14:09:50.0

FABIANE OLIVEIRA FARIAS

Avaliador Externo (33003017)

Assinatura Eletrônica

08/11/2021 17:10:40.0

LUCIANO LUCCHETTA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/11/2021 15:01:50.0

EDIMIR ANDRADE PEREIRA

Avaliador Externo (55002145)

Assinatura Eletrônica

08/11/2021 17:19:23.0

DEISE ROSANA SIMÕES

Avaliador Externo (40005011)

Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-930 - Tel: (41) 3361-3232 - E-mail: posalm@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 125884

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 125884

AGRADECIMENTOS

As professoras Dra. Maria Lucia Masson (UFPR) e Dra. Marina Leite Miterrer-Daltoé (UTFPR), pela orientação, coorientação, ideias, conversas e abertura para executar minhas ideias na velocidade em que eu as realizo.

Aos meus pais, pelo incentivo mesmo a distância.

Aos meus amigos do LABTECAL e LATOS, Carlos Toazza, Fabiane Farias, Grazielle Oliveira, José Pedro, Fernando Castro, Karina Ueda e Letícia Ronko. Imensa gratidão pela ajuda, amizade e apoio de vocês. Em especial para Fabiane que me mostrou a luz de como estruturar este documento para que ficasse didático e compreensível e ao Carlos que me auxiliou em grande parte das análises laboratoriais.

Também aos demais amigos e colegas do PPEGAL, obrigada pelo apoio e parcerias. Especialmente aos que tiveram presente no período de quarentena, a rede social de amizades formada foi importantíssima para manter a saúde mental no período, e durante todo o Doutorado.

Aos amigos e parceiros do PPGQ, Anne Sotiles e Rafael Sari, obrigada pela amizade e pelo conhecimento que agregaram ao meu trabalho.

Aos técnicos de laboratório.

A Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Engenharia Química por disponibilizar a estrutura necessária para realização desta tese.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E por fim, a todos que passaram nesta minha trajetória, obrigada de coração!

RESUMO

A raiz tuberosa do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é conhecida pelo alto teor de frutanos e carboidratos de baixo valor calórico, configurando um alimento com potencial prebiótico e de interesse para pessoas com restrições alimentares como os diabéticos. Contudo, existe uma grande dificuldade de conservação das raízes a longo prazo. Para isso, o suco de yacon é uma das alternativas de produto derivado com potencial de benefícios à saúde. Entretanto o escurecimento diminui sua aceitação frente ao consumidor, razão pela qual, o suco é um dos derivados menos explorados. O segundo tópico levantado neste estudo entra no cenário dos conservantes, que é o ácido lactobiônico (LBA), o qual apresenta barreiras legais para sua utilização em alimentos apesar das várias propriedades atribuídas a ele. As ações acidificante, emulsificante, quelante e atividade prebiótica são algumas das características atribuídas ao LBA, embora pouco exploradas na aplicação em produtos alimentícios. Considerando estes dois cenários, o objetivo geral do trabalho foi avaliar o efeito do ácido lactobiônico na vida útil, manutenção dos compostos bioativos, potencial prebiótico e escurecimento do suco de yacon puro durante o armazenamento refrigerado. Primeiramente, as melhores condições de conservação do suco de yacon encontradas foram branqueamento a vapor (10 min) + LBA 1%. O LBA e os ácidos orgânicos como o cítrico, málico, tartárico e ascórbico foram então avaliados quanto à manutenção dos compostos bioativos e cor do suco nas primeiras 48 horas de armazenamento refrigerado. A adição de ácido málico e LBA apresentaram-se como as mais eficazes e junto com a amostra controle (sem tratamento ácido) foram avaliados durante 180 dias quanto aos potenciais prebiótico, antioxidante, quelante de ferro e cálcio. O suco de yacon refrigerado pode ser considerado uma bebida funcional prebiótica, durante um armazenamento de longo prazo, por pelo menos 120 dias segundo o crescimento dos probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, e 105 dias para o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. O suco de yacon pós digestão *in vitro* (2% no meio de cultura MRS) apresentou potencial prebiótico equiparável ao potencial da amostra de glicose, FOS e inulina (2%), até o dia 105 de armazenamento para *B. animalis* e *L. acidophilus*, e 90 dias para o *L. lactis*. Ambos os ácidos testados foram capazes de dobrar a vida útil do suco de yacon, de 60 dias encontrado para a amostra Controle, para 120 dias. O LBA no suco de yacon refrigerado, como ingrediente prebiótico, não se destacou significativamente, com valores de crescimento dos probióticos superiores ao suco Controle, apenas no dia 120 de armazenamento para o *B. animalis* e *L. lactis*. Para os demais tempos de armazenamento e para o *L. acidophilus*, o perfil de potencial prebiótico do suco de yacon com LBA é semelhante ao da amostra Controle. Sendo assim, o LBA apresentou efetividade como acidulante, conservante, quelante de cálcio e ferro, antioxidante, e permitiu a estabilidade dos parâmetros de cor do suco de yacon refrigerado, porém sem efeito significativo como ingrediente prebiótico. O perfil sensorial completou este estudo, onde o Perfil Flash, *E-nose* e sensometria mostraram-se úteis para diferenciar as amostras de suco de yacon, com ácidos – usados para prever o comportamento do suco de yacon com LBA que não pode ser inserido na análise sensorial – e controle (sem ácidos), analisando os descritores mais bem correlacionados com cada uma. O suco com LBA mostrou grande semelhança ao suco de yacon com ácido tartárico, quanto aos sinais obtidos para os compostos voláteis. Sendo assim, os descritores do perfil sensorial do suco de yacon foram: Adstringência, sabor de ervas, odor de soja, sabor de cereal e folhas, gosto ácido e residual amargo.

Palavras-chave: *Smallanthus sonchifolius*, polifenol oxidases, escurecimento enzimático, bebida funcional, suco prebiótico, Perfil Flash, *E-nose*.

ABSTRACT

The tuberous root of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is known for its high content of fructans and low-calorie carbohydrates, configuring a food with prebiotic potential and of interest to people with dietary restrictions such as diabetics. However, there is great difficulty in preserving the roots in the long term storage. For this, yacon juice is one of the alternatives for a by-product with potential for health benefits. However, browning reduces its acceptance by the consumer, which is why the juice is one of the least explored derivatives. The second topic raised in this study enters the scenario of preservatives, which is lactobionic acid (LBA), which presents legal barriers to its use in food despite the various properties attributed to it. The acidifying, emulsifying, chelating and prebiotic activities are some of the characteristics attributed to LBA, although little explored in its application in food products. Considering these two scenarios, the general objective of this work was to evaluate the effect of lactobionic acid on shelf life, maintenance of bioactive compounds, prebiotic potential and browning of pure yacon juice during refrigerated storage. First, the best conservation conditions for yacon juice found were steam bleaching (10 min) + 1% LBA. LBA and organic acids such as citric, malic, tartaric and ascorbic were then evaluated for maintenance of bioactive compounds and juice color in the first 48 hours of refrigerated storage. The addition of malic acid and LBA were the most effective and together with the control sample (without acid treatment) they were evaluated for 180 days for prebiotic, antioxidant, iron and calcium chelating potentials. Refrigerated yacon juice can be considered a functional prebiotic drink, during long-term storage, for at least 120 days according to the growth of the probiotics *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, and 105 days for *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Yacon juice after in vitro digestion (2% in MRS culture medium) presented prebiotic potential comparable to the potential of glucose, FOS and inulin samples (2%), until day 105 of storage for *B. animalis* and *L. acidophilus*, and 90 days for *L. lactis*. Both acids tested were able to double the shelf life of yacon juice, from 60 days found for the Control sample, to 120 days. The LBA in refrigerated yacon juice, as a prebiotic ingredient, did not stand out significantly, with growth values of probiotics superior to the Control juice, only on day 120 of storage for *B. animalis* and *L. lactis*. For the other storage times and for *L. acidophilus*, the prebiotic potential profile of yacon juice with LBA was similar to that of the Control sample. Thus, LBA was effective as an acidulant, preservative, calcium and iron chelator, antioxidant, and allowed the stability of the color parameters of the refrigerated yacon juice, but without significant effect as a prebiotic ingredient. Sensory profile completed this study, where Flash Profile, E-nose and sensometrics were useful to differentiate yacon juice samples with acids - used to predict the behavior of yacon juice with LBA that cannot be inserted into the sensory analysis - from Control (acid-free sample), analyzing the descriptors best correlated with each one. The juice with LBA showed great similarity to the yacon juice with tartaric acid, regarding the signals obtained for the volatile compounds. Thus, the descriptors of the sensory profile of yacon juice were: Astringency, herbal flavor, soy odor, cereal and leaf flavor, acid taste and bitter aftertaste.

Keywords: *Smallanthus sonchifolius*, polyphenol oxidases, enzymatic browning, functional beverage, prebiotic juice, Flash Profile, E-nose.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LACTOBÍÔNICO	21
FIGURA 2 – MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DO YACON DESDE SUA ORIGEM NOS ANDES.....	32
FIGURA 3 – RAIZES DO YACON; A) RECENTEMENTE COLHIDAS, B) RAIZES LIMPAS E C) RAIZES CORTADAS APÓS DOIS MINUTOS, EVIDENCIANDO O ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO	33
FIGURA 4 – ESQUEMA DE ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO	40
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA RESUMIDO DO PROJETO.....	44
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SUCO DE YACON.....	46
SENDO MI A MASSA INICIAL DAS RAIZES COM CASCA E MS A MASSA DE SÓLIDOS RECUPERADA DA CENTRIFUGAÇÃO.....	47
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA SEQUENCIA DE TRATAMENTOS REALIZADOS PARA OBTER A COMBINAÇÃO DE TRATAMENTOS IDEAL PARA O SUCO DE YACON.....	50
FIGURA 8 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA COR DO SUCO DE YACON APÓS 48 H DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.	73
FIGURA 9 – <i>HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS</i> (HCA) DOS MODELOS MATEMÁTICOS UTILIZADOS PARA AJUSTAR OS DADOS DE ATIVIDADE DA PPO NA APLICAÇÃO NO LBA	81
FIGURA 10 – IMAGENS DE LBA OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM AMPLIAÇÃO DE 250X (A) E 1000X (B).	93
FIGURA 11 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM AMPLIAÇÃO DE 1000X (A) E 2000X (B).	93
FIGURA 12 – MICROSCOPIA DA ANÁLISE DE COLORAÇÃO GRAM DOS PROBIÓTICOS.	104
FIGURA 13 – COR DOS SUCOS DE YACON, ADICIONADO OU NÃO DE ÁCIDOS, DURANTE 120 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.	111
FIGURA 14 – INDICAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DE AÇÚCARES POR HPLC.....	125
FIGURA 15 – SUCO DE YACON COM (A) ÁCIDO MÁLICO SY-M, (B) CONTROLE SY-C, E (C) COM ÁCIDO TARTÁRICO SY-T.....	130

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – EMPRESAS COM PATENTES DE LBA VINCULADAS A ALIMENTOS	24
GRÁFICO 2 – ESTATÍSTICAS DE PESQUISA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO LBA; A) PRODUÇÃO CIENTÍFICA POR ANO; B) POR PAÍS C) E POR ÁREA CIENTÍFICA.	27
GRÁFICO 3 – RESPONSÁVEIS POR PATENTES DO YACON RELACIONADO COM BEBIDA, DRINK E SUCO (EMPRESAS E PESQUISADOR)	37
GRÁFICO 4 – ESTATÍSTICAS DE PESQUISA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO YACON; A) PRODUÇÃO CIENTÍFICA POR ANO; B) POR PAÍS C) E POR ÁREA CIENTÍFICA.	38
GRÁFICO 5 – ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASES NO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ÁCIDOS	78
GRÁFICO 6 – ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE DO ÁCIDO DL-MÁLICO A 30 °C	91
GRÁFICO 7 – PADRÃO DE DRX OBTIDO PARA O LBA.	92
GRÁFICO 8 – PADRÃO DE DRX OBTIDO PARA O ÁCIDO DL-MÁLICO.	92
GRÁFICO 9 – CURVAS TGA/DTG PARA O LBA.	94
GRÁFICO 10 – CURVAS TGA/DTG PARA DL-ÁCIDO MÁLICO.	94
GRÁFICO 11 – COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E QUELANTE DAS SOLUÇÕES DE ÁCIDO MÁLICO E LBA, 10 E 40%.	98
GRÁFICO 12 – PERFIL DE QUEBRA DOS GÉIS DE PECTINA	99
GRÁFICO 13 – SINÉRESE DE GÉIS DE PECTINA HM DURANTE TRÊS CICLOS DE DESCONGELAMENTO (72 H), COM ÁCIDOS MÁLICO, CÍTRICO E LBA.	100
GRÁFICO 14 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS DE SUCO DE YACON DURANTE 120 DE ARMAZENAMENTO CONSIDERANDO TODAS AS ANÁLISES DISCUTIDAS.	106
GRÁFICO 15 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS SOBRE A REPRESENTATIVIDADE DAS ANÁLISES DISCUTIDAS.	107
GRÁFICO 16 – COMPORTAMENTO DO PH DURANTE O ARMAZENAMENTO.	109
GRÁFICO 17 – COMPORTAMENTO DA ACIDEZ, EXPRESSA EM % DE ÁCIDO MÁLICO, DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.	110
GRÁFICO 18 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR L* (LUMINOSIDADE; BRANCO-PRETO) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.	112
GRÁFICO 19 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR A* (VERDE-VERMELHO) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.	113
GRÁFICO 20 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR B* (AZUL-AMARELO) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.	113
GRÁFICO 21 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR C* (INTENSIDADE DE COR) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.	114
GRÁFICO 22 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR RADICAL DPPH DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.	116
GRÁFICO 23 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR RADICAL ABTS DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.	117

GRÁFICO 24 – ATIVIDADE QUELANTE DE ÍONS FERRO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.....	118
GRÁFICO 25 – ATIVIDADE QUELANTE DE ÍONS CÁLCIO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.....	119
GRÁFICO 26 – POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO QUANTO AO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA <i>B. ANIMALIS</i>	121
GRÁFICO 27 – POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO QUANTO AO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA <i>L. LACTIS</i>	122
GRÁFICO 28 – POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO QUANTO AO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA <i>L. ACIDOPHILUS</i>	123
GRÁFICO 29 – PCA DOS DESCRITORES DO PERFIL FLASH DO SUCO DE YACON, COM ÁCIDO MÁLICO (SY-M), ÁCIDO TARTÁRICO (SY-T) E CONTROLE, SEM ÁCIDOS (SY-C).....	131
GRÁFICO 30 – CONFIGURAÇÃO CONSENSUAL DOS RESULTADOS DO PERFIL FLASH PARA AMOSTRAS DE SUCO YACON.	132
GRÁFICO 31 – SINAL TRANSITÓRIO, APÓS PRÉ-TRATAMENTO, PARA OS SENSORES (A) MQ3 E (B) MQ9.....	135
GRÁFICO 32 – GRÁFICO DE ESCORES PARA OS COMPOSTOS VOLÁTEIS NAS AMOSTRAS ANALISADAS NO NARIZ ELETRÔNICO.....	136
GRAFICO 33 – SINAIS NOS SENSORES DO <i>E-NOSE</i> PARA F1.....	136
GRÁFICO 34 – DENDROGRAMA PARA AMOSTRAS DE SUCO DE YACON ANALISADAS NO NARIZ ELETRÔNICO.	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA COMBINAÇÃO DE TRATAMENTOS PARA O SUCO DE YACON.....	49
TABELA 2 – RESULTADOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E DO CONTEÚDO FENÓLICO DO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS.....	71
TABELA 3 – RESULTADOS DO PH E COR DO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS.....	74
TABELA 4 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE COR E ΔE DO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS	75
TABELA 5 – CINÉTICA DA ATIVIDADE DA PPO NO SUCO DE YACON DE DIFERENTES TRATAMENTOS ÁCIDOS	78
TABELA 6 – A CINÉTICA DA ATIVIDADE DAS PPOS NO SUCO DE YACON COM OS MODELOS WEIBULL, ORDEM ZERO, PRIMEIRA ORDEM E PLS.....	80
TABELA 7 – RESULTADOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E DO CONTEÚDO FENÓLICO DO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS ÁCIDOS.....	83
TABELA 8 – RESULTADOS DO PH E COR DO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS ÁCIDOS.....	83
TABELA 9 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE COR E ΔE DO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS ÁCIDOS	84
TABELA 10 – RESULTADOS DA MANOVA E VARIÁVEIS DISCRIMINANTES QUE ACESSAM O COMPORTAMENTO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO DE 120 DIAS.....	105
TABELA 11 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS SUCOS DE YACON, COM E SEM ÁCIDOS ADICIONADOS, DURANTE 120 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO	108
TABELA 12 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE COMPOSTOS FENÓLICOS E POLIFENÓIS EXTRAÍVEIS TOTAIS, DOS SUCOS DE YACON, COM E SEM ÁCIDOS ADICIONADOS, DURANTE 120 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO	115
TABELA 13 – DESCRITORES LEVANTADOS PARA O SUCO DE YACON CONTROLE E COM ÁCIDOS CONSERVANTES	129
TABELA 14 - ATRIBUTOS MELHOR CORRELACIONADOS COM AS DIMENSÕES 1 E 2 $ R > 0,80$ NO RESULTADO DO PERFIL FLASH DO SUCO YACON.....	128
TABELA 15 – ACEITAÇÃO, AVALIAÇÃO HEDÔNICA E INTENÇÃO DE COMPRA DO SUCO DE YACON.....	138

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO DE DOUTORADO	43
QUADRO 2 – REAGENTES UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA COMBINAÇÃO DE TRATAMENTOS PARA CONSERVAÇÃO DO SUCO DE YACON.....	50
QUADRO 3 – REAGENTES UTILIZADOS PARA AS PROPRIEDADES DO ÁCIDO MÁLICO.	56
QUADRO 4 – REAGENTES UTILIZADOS PARA O ESTUDO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AA(T)	- atividade antioxidante (total)
AA	- ácido ascórbico
ABTS	- 2,2-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico) Sal Diamonico
AT	- acidez titulável
BHA	- butil hidroxianisol
BHT	- butil hidroxitolueno
CA	- ácido cítrico
CBI	- <i>Centre for the Promotion of Imports</i>
CI	- concentração inibitória
cm	- centímetro
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DRX	- Difração de Raio X
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- <i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FO	- <i>first order</i> (primeira ordem)
FOS	- frutooligossacarídeos
g	- grama
GGALI	- Gerência-Geral de Alimentos
GOS	- galactooligossacarídeos
h	- hora
ha	- hectare
HCA	- <i>hierarchical cluster analysis</i> (análise hierárquica de cluster)
k	- atividade enzimática
kg	- kilograma
kJ	- kilo Joule ($1\text{Joule}.10^3$)
LBA	- ácido lactobiônico
M	- Molar
MA	- ácido málico
MAE	- <i>mean absolute error</i> (erro absoluto médio)
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura

min	- minuto(s)
mg	- miligrama
mL	- mililitro
mm	- milímetro
mM	- milimol
MRE	- <i>mean relative error</i> (erro relativo médio)
MRS	- <i>Man, Rogosa and Sharpe</i> (Ágar e Caldo)
nm	- nanômetro(s)
PCA	- <i>Principal Component Analysis</i>
PET	- polifenóis extraíveis totais
pH	- potencial Hidrogeniônico
PLS	- <i>Partial Least Squares</i>
ppm	- partes por milhão (proporção)
PPO	- polifenoloxidase
PT	- pré-tratamento
RMSE	- <i>root mean squared error</i> (erro quadrático médio)
RMSEC	- <i>root mean squared error of calibration</i> (erro da calibração - PLS)
RMSECV	- <i>root mean squared error of cross validation</i> (erro de validação cruzada - PLS)
TA	- ácido tartárico
TGA/DTG	- análise de termogravimetria e termogravimetria derivada
ton	- tonelada
U	- unidade de atividade
ZO	- <i>zero order</i> (ordem zero)
°C	- graus Celcius
°Brix	- % sólidos solúveis
μL	- microlitros (10 ⁻⁶ L)

LISTA DE SÍMBOLOS

©	<i>Copyright</i>
@	Arroba
®	marca registrada - <i>registered trademark</i>
R\$	moeda real
%	porcentagem (g.100g ⁻¹)
β 2 → 1	ligação do tipo β, Carbono 2 com Carbono 1 a outra molécula
●	Radical
™	<i>unregistered trademark</i>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E ESTADO DA ARTE ATUAL.....	19
1.1	INTRODUÇÃO.....	19
1.2	REVISÃO DE LITERATURA	21
1.2.1	Ácido Lactobiônico	21
1.2.1.1	Processos de obtenção	22
1.2.1.2	Segurança alimentar	23
1.2.1.3	Patentes e registros	24
1.2.1.4	Produção mundial e estatísticas de pesquisa.....	25
1.2.1.5	Potencial na indústria de alimentos	27
1.2.2	A Raiz Do Yacon.....	29
1.2.2.1	Propriedades e composição da raiz do yacon	29
1.2.2.2	Produção, variedades e aplicações do yacon	31
1.2.2.3	As polifenoloxidasas no yacon	34
1.2.2.4	Bebidas de yacon.....	35
1.2.2.5	Patentes e estatísticas de pesquisa do yacon.....	36
2	CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS E ESCOPO DO DOCUMENTO.....	39
2.1	OBJETIVO GERAL.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
2.3	ESCOPO DO DOCUMENTO.....	40
2.4	CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	43
3	CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1	PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA	45
3.1.1	Obtenção do yacon	45
3.1.2	Caracterização da raiz de yacon	45
3.1.3	Extração do suco e rendimento.....	45
3.2	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO SUCO DE YACON	47
3.2.1	Planejamento experimental.....	48
3.2.2	Reagentes utilizados nesta etapa.....	50
3.2.3	Análises	52
3.2.3.1	Atividade das PPOs	52
3.2.3.2	Cinética enzimática	52
3.2.3.3	Atividade Antioxidante Total (AAT)	54
3.2.3.4	Compostos fenólicos totais.....	54
3.2.3.5	Cor.....	54
3.2.3.6	pH e acidez titulável (AT)	55
3.3	COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO LBA COM O ÁCIDO MÁLICO.....	55
3.3.1	Reagentes utilizados nesta etapa.....	55
3.3.2	Análises adicionais	57

3.3.2.1	Comportamento com a água.....	57
3.3.2.2	Estrutura química e perfil térmico	58
3.3.2.3	Capacidade quelante.....	58
3.3.2.4	Atividade antimicrobiana	59
3.3.2.5	Estabilidade de géis de pectina	60
3.4	POTENCIAL PREBIÓTICO E ESTABILIDADE DO SUCO DE YACON.....	61
3.4.1	Reagentes utilizados nesta etapa.....	61
3.4.2	Análises adicionais	62
3.4.2.1	Microbiologia das amostras de suco de yacon.....	62
3.4.2.2	Polifenóis extraíveis totais (PET)	62
3.4.2.3	Reativação de cepas e coloração gram	62
3.4.2.4	Análise do potencial prebiótico in vitro.....	63
3.4.2.5	Indicação de bioconversão de açúcares por HPLC.....	64
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	64
3.6	PERFIL SENSORIAL DE SUCO DE YACON.....	64
3.6.1	Seleção de avaliadores para avaliação de odor e sabor.....	65
3.6.1.1	Preparo das amostras	65
3.6.1.2	Aplicação do teste de seleção	65
3.6.1.3	Tratamento de dados da seleção	66
3.6.2	Perfil descritivo pelo método Perfil Flash	66
3.6.2.1	Preparo das amostras	66
3.6.2.2	Levantamento individual de terminologias.....	66
3.6.2.3	Avaliação das amostras de suco	67
3.6.2.4	Análise estatística dos resultados do Perfil Flash	67
3.6.2.5	Aceitabilidade e intenção de compra	67
3.6.3	E-nose.....	67
3.6.3.1	Pre-processamento dos dados do E-nose.....	68
3.6.3.2	Análise sensométrica exporatória dos dados do E-nose	68
4	CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DAS PPOS EM SUCO DE YACON	70
4.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS DAS RAIZES	70
4.2	COMBINAÇÃO DE TRATAMENTOS PARA SUCO DE YACON	70
4.2.1	Efeitos do pré-tratamento e branqueamento	72
4.2.2	Influência do LBA na atividade antioxidante e fenólicos totais	76
4.2.3	Efeito do LBA no ph do suco de yacon.....	76
4.3	A CINÉTICA DAS PPOS EM SUCO DE YACON	77
4.3.1	Tratamentos com ácidos	81
4.4	CONCLUSÕES.....	86
5	CAPÍTULO 5 – COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO MÁLICO COM AS DO LBA.....	88
5.1	INTRODUÇÃO E HIPÓTESES	88
5.2	LBA VS. ÁCIDO MÁLICO.....	90

5.3	CONCLUSÕES.....	101
6	CAPÍTULO 6 – POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON COM LBA E AVALIAÇÃO DA VIDA ÚTIL DO SUCO DE YACON.....	103
6.1	INTRODUÇÃO E HIPÓTESES	103
6.2	ABORDAGEM MULTIVARIADA PARA ANÁLISE INICIAL	104
6.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE SEGURANÇA ALIMENTAR.....	107
6.4	INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DOS ÁCIDOS NOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	108
6.5	INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DOS ÁCIDOS NA COR DOS SUCOS	110
6.6	INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NO CONTEÚDO FENÓLICO.....	115
6.7	INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DOS ÁCIDOS NAS ATIVIDADES QUELANTE E ANTIOXIDANTE.....	116
6.8	INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DO LBA NO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON	120
6.9	BIOCONVERSÃO DOS AÇÚCARES.....	124
6.10	CONCLUSÕES.....	126
7	CAPÍTULO 7 – PERFIL SENSORIAL DO SUCO DE YACON	128
7.1	INTRODUÇÃO.....	128
7.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	129
7.2.1	Seleção.....	129
7.2.2	Perfil Flash	129
7.2.3	Resultados quimométricos do e-nose	134
7.2.4	Aceitabilidade e intenção de compra do suco de yacon	138
7.3	CONCLUSÃO.....	139
8	CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PRODUÇÃO CIENTÍFICA	140
9	CAPÍTULO 9 – REFERÊNCIAS E APÊNDICES	149
9.1	REFERÊNCIAS	149
	ANEXO A	161
9.2	APÊNDICES	162
	APÊNDICE A	162
	APÊNDICE B.....	163
	APÊNDICE C.....	167

PARTE I

Motivação, revisão de literatura, objetivos e metodologia

Nesta primeira parte serão apresentados a introdução, com a motivação para realização deste trabalho, além de uma revisão de literatura sobre os temas abordados, com o estado da arte atual. Adicionalmente, serão apresentados os materiais e metodologias utilizadas para que de forma objetiva fique claro o fluxograma de trabalho.

CAPÍTULO 1 – Introdução, Revisão de literatura e Estado da arte atual

1.1 Introdução

Derivados da lactose vem sendo cada vez mais investigados quanto a sua obtenção e aplicação tecnológica, na tentativa de abranger mais nichos de mercado, os quais buscam atender as necessidades dos consumidores gradativamente mais exigentes. Entre os derivados mais estudados da lactose, o ácido lactobiônico (LBA) vem se destacando como ingrediente em potencial na indústria alimentícia. Propriedades prebióticas, antioxidantes, quelantes e carreadoras de minerais, são atribuídas a ele nas mais diversas áreas de estudo.

Escassos são os estudos envolvendo a aplicação do LBA em alimentos e ingestão humana pois ele não se encontra na legislação vigente (europeia e americana) e, portanto, não pode ser aplicado e testado sensorialmente. Mais estudos sobre a segurança em ingeri-lo devem ser realizados nos próximos anos. Sendo assim, é necessária uma avaliação quantitativa das propriedades do LBA que podem ser úteis para a indústria de alimentos.

Inserido neste cenário nutracêutico, a raiz tuberosa do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) figura como alimento de interesse para diabéticos, pois além de prebiótica e com teores expressivos de antioxidantes, fornece carboidratos para a dieta com baixo teor calórico. De produção relativamente simples e rendimento superior a outras raízes semelhantes, a América do Sul é a maior produtora mundial, com destaque para o Peru, fornecendo a raiz e seus derivados principalmente para a União Européia e Japão. Aproximadamente 22 toneledas de yacon entraram na Europa em 2015, último ano em que foi realizada essa estimativa.

Alimentos não industrializados possuem forte apelo de saúde nos dias atuais, porém sua vida útil é curta quando comparada aos processados, o que acarreta em expressivo desperdício de matéria-prima vegetal entre colheita e consumo, valor este que chega a até 40%. Portanto, derivados do yacon estão sendo estudados, para manter os nutrientes da raiz na forma de produtos de vida útil prolongada, como farinhas, panificados, chips e sucos mistos.

Na tentativa de conservar os nutrientes da raiz da planta yacon, o suco de yacon é uma das alternativas de produto derivado com benefícios a saúde em potencial. Contudo, ele ainda é um dos menos explorados na área científica devido a sua baixa aceitação decorrente do escurecimento pronunciado. Com isto, o suco de yacon instiga a curiosidade sobre sua estabilidade enquanto produto refrigerado, métodos de possível conservação e estratégias de aumento da vida útil. Relacionado a isto, o ácido lactobiônico, que possui várias propriedades em potencial, relacionadas à conservação e enriquecimento/sinergia em alimentos, e ainda

precisa ser investigado quanto aos efeitos em matrizes alimentícias. Considerando todos os efeitos benéficos citados, o yacon e o LBA são considerados matérias-prima e ingredientes promissores, de alto valor econômico e potencialmente benéficos à saúde.

1.2 Revisão de literatura

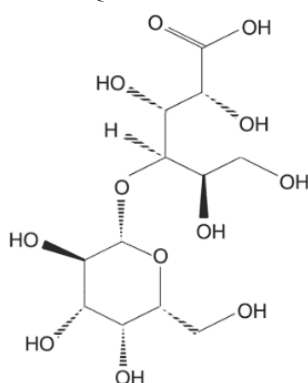
Nesta seção será apresentada uma breve revisão da literatura sobre os principais temas envolvidos neste trabalho: Ácido lactobiônico e yacon.

1.2.1 Ácido lactobiônico¹

O ácido lactobiônico (LBA) é um dos derivados da lactose, que é estudado devido suas potenciais propriedades. Raramente encontrado na natureza, ele se apresenta na forma cristalizada de pó branco. Consiste em um polihidroxiácido, o ácido glicônico, ligado a um açúcar, a galactose (Figura 1), e sua fórmula química é $C_{12}H_{22}O_{12}$. A nomenclatura bioquímica o define como ácido 4-O- β -galactopiranosil-D-glucônico, e sua estrutura permite solubilidade em água, e baixa solubilidade em solventes orgânicos como etanol, ácido acético glacial e metanol. Ele possui um pKa de 3,6 e massa molecular de 358,3 (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013).

A estrutura do LBA permite sua hidrólise em ácido aldônico e uma aldose, onde é possível identificar a parte redutora de um dissacarídeo divididos em dois açúcares similares segundo Pigman, Wolfrom e Peat (1948). O LBA primeiramente foi sintetizado por Fischer e Meyer em 1889 por meio da oxidação da lactose com bromina. Os pesquisadores prepararam lactobionato de cálcio amorfo mas foram incapazes de cristalizá-lo, o qual permaneceu então em solução na forma de ácido (ISBELL, 1933; PIGMAN; WOLFROM; PEAT, 1948).

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO



FONTE: GUPTA et al., (2017).

¹ Desse tópico do Capítulo 1, surgiu a base teórica, e a necessidade de unir informações sobre o LBA, para o artigo de Revisão publicado: CARDOSO, T.; MARQUES, C.; et al. Lactobionic Acid as a Potential Food Ingredient: Recent Studies and Applications. Journal of Food Science, v. 84, n. 7, p. 1672–1681, jul. 2019.

1.2.1.1 Processos de obtenção

A preparação do lactobionato atualmente é realizada também pela área biotecnológica, sendo obtido a partir de microrganismos e suas enzimas. Contudo, inicialmente foi obtido por método eletrolítico por meio da lactose (ISBELL, 1933), e apesar das vantagens do método biotecnológico, a produção de LBA por fermentação ainda é ínfima quando comparada aos ácidos orgânicos convencionais (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013). A oxidação eletrolítica demanda grande quantidade de energia, catalisadores metálicos caros e danosos ao meio ambiente assim como os resíduos metálicos do processo (GUPTA et al., 2017; MURAKAMI et al., 2008).

A obtenção do LBA por via bacteriana foi primeiramente testada com espécies de *Pseudomonas* por Stodola e Lockwood (1947), mais precisamente a *Pseudomonas taetrolens* (conhecida antes como *P. graveolens*) obteve o melhor rendimento, na época considerado bom, em torno de 75%. Outras espécies como as *P. mucidolens*, *P. myxogenes* e *P. fluorescens* também foram eficazes na produção dos ácidos biônicos² com a lactose, e além dela, maltose e isomaltose, mostrando um futuro promissor para este tipo de produção. não só com a lactose como fonte de carbono (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2011; GODERSKA; SZWENGIEL; CZARNECKI, 2014; STERNBERG; LOCKWOOD, 1969).

Os métodos de purificação e separação molecular evoluíram com os anos e a precipitação com etanol proposto por Stodola e Lockwood (1947) foi substituído por cromatografia de troca iônica com 100% de rendimento e identificação dos compostos de forma segura e rápida (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013; PEDRUZZI; DA SILVA; RODRIGUES, 2008), mas que ainda carrega o inconveniente do custo.

Uma das possibilidades mais interessantes para obtenção e isolamento do LBA é a utilização do soro de leite, subproduto do processamento de queijos, como estudado por Alonso, Rendueles e Díaz (2011), que obtiveram 100% de rendimento em LBA. O processo se destaca pelos resultados e seu custo-benefício, um meio de cultura barato para a produção biotecnológica, reutilização sustentável do ponto de vista ambiental, que diminui também o custo do tratamento de resíduos. As expectativas para o futuro da obtenção de LBA residem na completa transição da escala laboratorial e piloto para a industrial utilizando a biotecnologia (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013).

² Os ácidos biônicos, como o ácido lactobiônico, são derivados da lactose. Conhecidos mais na área farmacêutica e cosmética, são atribuídos a eles propriedades de hidratação de pele, além de antioxidantes.

1.2.1.2 Segurança alimentar

O FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) considera que o sal do ácido lactobiônico, mais especificamente o lactobionato de cálcio, é seguro para consumo humano, desde que usado em quantidade suficiente para o efeito desejado no alimento. Sendo que geralmente os sais de cálcio possuem baixa solubilidade, o lactobionato se apresenta como um sal solúvel em água, demonstrando vantagem tecnológica sobre os demais, juntamente com os lactobionatos de sódio e potássio (MALVESSI et al., 2013; MURAKAMI et al., 2008).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) informou em resposta a protocolo aberto 2017862367 que não há registro do produto na base de dados da GGALI-Gerência-Geral de Alimentos, e que o LBA também não passou por avaliação de segurança (Anexo A). Isso significa que a falta de estudos sobre o LBA ainda não o colocou nos radares da fiscalização e portanto não pode ser utilizado para consumo humano. A principal preocupação para essa proibição, são os resíduos metálicos que provém da obtenção tradicional.

A União Européia rejeitou a inclusão do LBA na lista de ingredients de alimentos, ainda em 2009 (EUROPEAN COMMISSION, 2009). Este fato gera uma controvérsia sobre o uso do LBA, já que o uso do lactobionato (sal) é permitido, e seria equivalente ao uso do LBA em solução, pois o sal em contato com um meio aquoso se dissocia em seu ácido correspondente.

O único estudo que testou quantidades de LBA em humanos em 1994, encontrou fermentação no cólon com 24g de ingestão, sinais de inchaço e flatulência nos avaliadores em teste, e evidências de que o ácido interfere na absorção da lactose, por meio de teste padrão de tolerância á lactose. Eles concluíram que altas doses de LBA causaram os mesmos sintomas de intolerância da lactose (DOKKUM et al., 1994), porém em quantidades corretas poderia auxiliar nas funções e fluxo intestinais. Vale ressaltar que este estudo de 1994 foi feito antes da legislação que negou o registro do LBA em alimentos na Europa.

Não há estudos sobre a toxicologia do LBA. As fichas técnicas do ácido lactobiônico, mencionam que o produto pode causar irritação nas mucosas do corpo, mas que estudos aprofundados devem ser feitos sobre sua toxicologia, pois não há evidência humana e/ou animal para classificá-lo como perigoso para ingestão (CAYMAN CHEMICAL, 2014; SANTA CRUZ, 2011). Em outras palavras, não existem relatórios de exposição e ingestão seguras realizados pelas agências e organizações oficiais como OSHA (Occupational Safety and Health Administration), ACGIH (Association Advancing Occupational and Environmental Health), NIOSH (Natl. Inst. for Occupational Safety and Health) e outras (CARDOSO et al., 2019a).

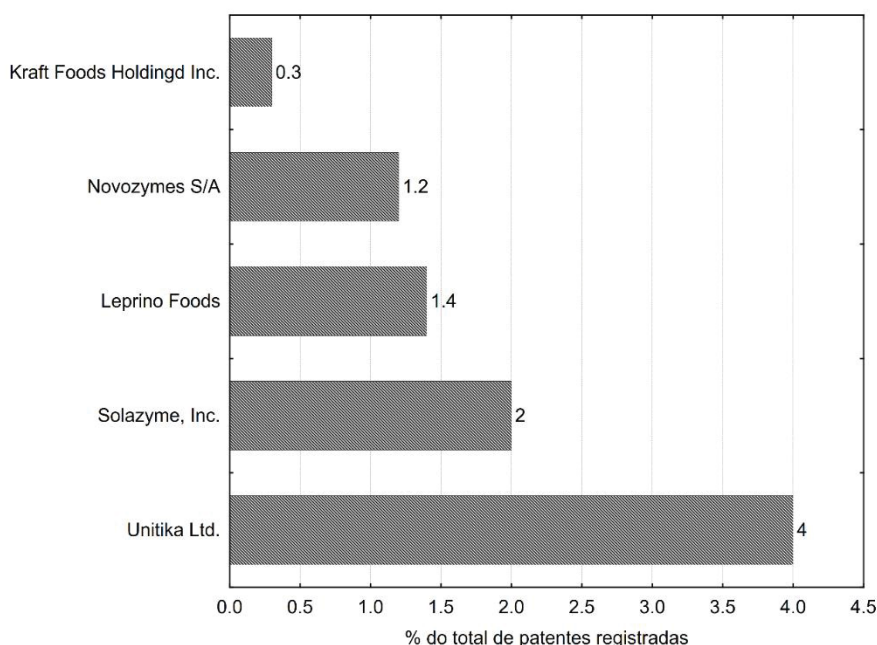
1.2.1.3 Patentes e registros

Patentes do mundo todo relatam estudos com LBA, sendo que as primeiras obtenções foram registradas em 1927 (ARTHUR; WALTER, 1927), e as pesquisas mais recentes ainda tentam aprimorar essa obtenção, como a utilização do lactobionato de sódio e troca catiônica como demonstrado por Mirgorod e Emelyanov (2015).

No registro de patentes sobre o LBA mais de 18.000 resultados filtram as 12 empresas que mais se destacam. A Astex da Inglaterra, Saul de Israel, ambas do ramo farmacêutico e as demais configuram maioria Americana (EUA) e também voltadas para pesquisa de medicamentos. A empresa que mais registrou patentes com LBA (Astex) agrega 6,5% do total de patentes do LBA.

Quando se trata da vinculação aos alimentos (Gráfico 1), cerca de 1.700 resultados são encontrados e as principais empresas e institutos de pesquisa mudam de nacionalidade, Unitika é japonesa e Solazyme é americana e ambas somam 6% das patentes relacionando LBA aos alimentos. Mesmo não sendo a aplicação em alimentos que se destaca hoje em dia, algumas patentes demonstram efeitos importantes do LBA na matriz alimentar.

GRÁFICO 1 – EMPRESAS COM PATENTES DE LBA VINCULADAS A ALIMENTOS



Os valores representam a porcentagem que a empresa registrou do total de patentes do LBA, relacionadas a alimentos. FONTE: Google patents, (2018). Gráfico: A autora (2020).

Dentre as patentes que aplicam LBA em alimentos, alguns estudos se destacam. Como o da Novozymes A/S (NIELSEN, 2012) que provou o efeito de retenção de água do LBA em produtos cárneos, com adição de uma solução com aproximadamente 8% de LBA em carne de peixe moída, posteriormente a mistura foi congelada e descongelada para mensurar a perda de água. Outra função atribuída, como acidificante, é corroborada pela empresa Leprino Foods (MERRILL; SINGH, 2005) que desenvolveu queijos macios e semi-duros com acidificação seguida de cultura starter. A acidificação foi feita com LBA até pH (5,1-5,9) porém nenhum possível efeito na matriz alimentícia foi discutido.

A empresa Kraft Foods desenvolveu uma patente com resultados importantes na área de bebidas (BALDWIN et al., 2010). Bebidas fortificadas com cálcio tem forte apelo pois o consumo regular e enriquecido de cálcio pode adiar os efeitos da osteoporose. Essa patente utilizou a propriedade quelante de minerais que possui o LBA, adicionando à bebidas um complexo de LBA (50-90%) com hidróxido de cálcio (5-25%) e ácido cítrico (2-20%). Nenhum sabor residual foi reportado pelo painel sensorial utilizado no estudo. Claramente o uso de painel sensorial em estudo com LBA chama a atenção, porém o estudo foi feito e a patente enviada antes da legislação Européia de 2009 que definiu a não permissão do LBA.

Outras patentes mostraram a ampla possibilidade de aplicação do LBA. A empresa Arla Foods (SUNDGREN; RAY; NIELSEN, 2017), registrou derivados lácteos com enzimas lactose-oxidases para converter lactose em LBA. Preparados de fruta do tipo suco comprovaram o enriquecimento pela adição de LBA (THOMAS; ALIREZA, 2008) e a empresa Ajinomoto Company (SATO, 2016), registrou um queijo preparado com oxidases para converter lactose em LBA, e obtiveram boas avaliações sensoriais quanto a firmeza da matriz láctea obtida.

É possível observar a tendência de adição do LBA no alimento, na forma de um complexo, e em poucos relatos em solução. Também, a possibilidade da conversão da lactose em LBA no próprio produto. Nas áreas das principais aplicações do LBA atualmente, os cosméticos são dominados por formulações com LBA em cremes. A França domina o setor com a empresa L'Oréal (13,8% das patentes), dentre outras como a Johnson & Johnson (3,5%) e a Avon (2,6%), conhecidas no Brasil e no mundo.

1.2.1.4 Produção mundial e estatísticas de pesquisa

Aproximadamente 15 mil toneladas de LBA por ano são produzidos por seletas empresas. Essa é considerada uma pequena quantidade, com apenas 5% de crescimento ao ano,

o que não afeta as reservas de lactose pura do mundo (AFFERTSHOLT, 2007; CORREDIG, 2009; ILLANES et al., 2016).

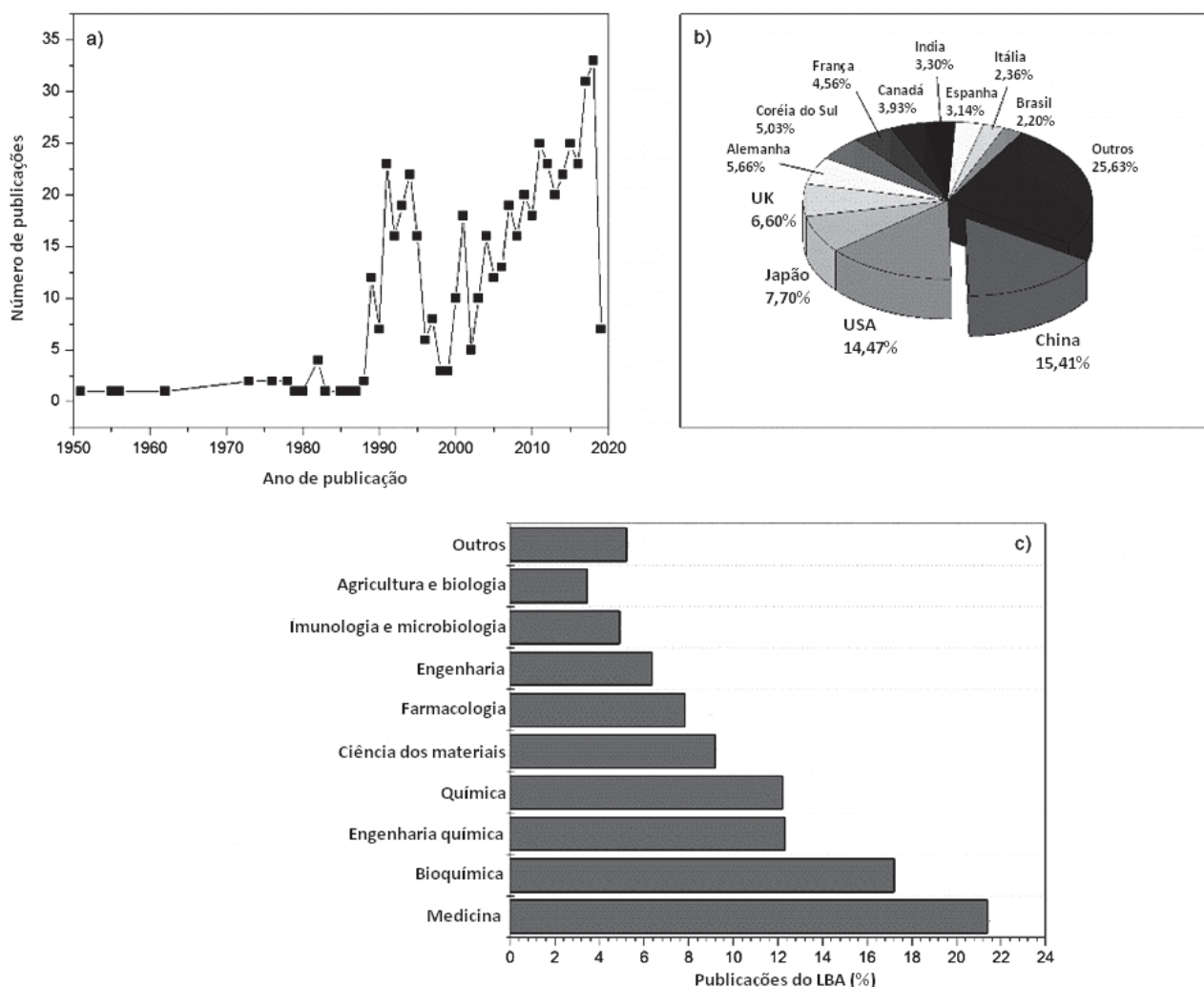
Os maiores produtores mundiais de LBA são Solvay (Alemanha), Friesland Campina Domo (Nova Zelândia), Sandoz (Alemanha), Reliable Biopharmaceutical Corporation (EUA) e o US Dairy Ingredient Company (EUA) (AFFERTSHOLT, 2007; ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2015). Entretanto, segundo relatório de 2017 sobre o mercado de LBA (*Lactobionic Acid Market Research Report 2017*), os países que movimentam o comércio são: EUA, Alemanha, China, Japão e Índia. O mesmo relatório também prevê crescimento expressivo das vendas até 2021. Contudo, fica claro que os mercados foco do LBA não compreendem o de alimentos ainda.

Apesar disso, o LBA tem amplo potencial de aplicação nas indústria de alimentos, além da química e farmacêutica (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013; GUTIÉRREZ et al., 2013) e vem sendo cada vez mais estudado (Gráfico 2), tanto quanto sua obtenção, mas também suas propriedades tecnológicas.

A plataforma de busca Scopus (2019) possibilitou a obtenção de dados estatísticos importantes sobre a produção científica relacionada ao LBA. Artigos de pesquisa, resenhas, capítulos de livros e artigos de conferências contendo *Ácido Lactobiônico* como termo mencionado no título ou nas palavras-chave, somaram 523 resultados desde o ano de 1951 (Gráfico 2a).

No Gráfico 2a é possível observar o aumento do LBA como objeto de pesquisa ao longo dos anos. O aumento de artigos e revisões de pesquisa publicados nos últimos 70 anos apenas confirma o crescente interesse nesse composto, que atingiu seu máximo com 33 publicações em 2018 e pode se expandir para a área de alimentos quando sua toxicologia estiver definida. A China é o país líder em pesquisa publicada sobre o LBA (Gráfico 2b), seguida pelos EUA, Japão e Inglaterra. Os resultados corroboraram o que foi encontrado com o estudo de patentes, onde a área de Medicina se destaca na exploração do LBA (Gráfico 2c).

GRÁFICO 2 – ESTATÍSTICAS DE PESQUISA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO LBA; A) PRODUÇÃO CIENTÍFICA POR ANO; B) POR PAÍS C) E POR ÁREA CIENTÍFICA.



FONTE: Scopus (2019); Gráfico: Adaptado de Cardoso et al., (2019).

1.2.1.5 Potencial na indústria de alimentos

O LBA é um forte quelante metálico e por isso uma de suas aplicações na área médica é para estabilização de órgãos antes de transplantes segundo Corredig (2009), reduzindo o dano oxidativo, aumentando a estabilidade e preservação dos tecidos. Essa mesma propriedade auxilia na captura de íons o que propicia sua aplicação em detergentes. Suas características como umectante, queratinizante e antioxidante também são aproveitadas para aplicação em cosméticos, como produtos anti-envelhecimento (GUTIÉRREZ et al., 2013; ILLANES et al., 2016).

Além disso o LBA é um ótimo carreador para o cálcio, auxiliando na suplementação deste micronutriente e, portanto, é aplicado como carreador de princípios ativos em

medicamento e nanomateriais. Nos alimentos, apesar das proibições para consumo humano, pesquisas estão demonstrando sua utilização como acidulante com gosto adocicado, aditivo em queijos, agente texturizante e fortificante de bebidas com fornecimento de minerais como ferro e cobre (BALDWIN et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2013; MCSWEENEY; FOX, 2009).

Estudos recentes também apontaram que o LBA aumentou o efeito de sinergismo entre nisina e timol contra a *L. monocytogenes* mas não obteve o mesmo resultado com a *E. coli* (CHEN; ZHONG, 2017), o que reforça sua possível atuação como agente antimicrobiano. Como fonte natural de LBA, pode-se citar o Iogurte do Mar Cáspio o qual apresenta características semelhantes ao Kefir, sendo muito consumido no Japão de acordo com Kiryu et al., (2009). Isso evidencia consumo de LBA, por humanos, principalmente no Japão.

O complexo de cálcio proveniente do LBA, por sua vez, pode ser aplicado em diversas bebidas e leite (devido ao sabor adocicado) e em bebidas energéticas (por formar complexos com minerais). Este complexo foi estudado para o desenvolvimento de suplementos com o intuito de prevenir a deficiência de cálcio (BALDWIN et al., 2010; PLEISSNER et al., 2017). O LBA e seus complexos apresentam resistência às enzimas digestivas e atuam como competidores diretos da lactose pela ligação beta galactosidase do intestino, o que o torna um composto com efeitos prebióticos em potencial (ADEBOLA; CORCORAN; MORGAN, 2014; GARCÍA; RENDUELES; DÍAZ, 2017; SCHAAFSMA, 2008) o que pode justificar a interferência na absorção da lactose mencionada anteriormente.

As propriedades reológicas, efeitos sobre a mobilidade de sódio e características de odor de géis lácteos acidificados com LBA foram atributos investigados por Ribeiro et al. (2016). O ácido lactobiônico mostrou ser um acidificante eficiente em produtos lácteos que precisam de uma etapa de gelificação. Os resultados foram comparados aos obtidos com glucono delta-lactona (GDL), um acidulante aplicado regularmente em laticínios, e demonstraram pequenas diferenças.

Não tendo muito claro, principalmente de modo quantitativo, as propriedades físico-químicas do LBA que podem ser úteis para indústria de alimentos, estudo recente esclareceu diversos potenciais³. O LBA sólido demonstrou alta higroscopicidade, 21% (UR de 75%) e 45% (UR de 90%), o que pode ser observado em seu manuseio. Sua solubilidade provou ser 30% superior ao até então reportado pela literatura. O potencial antioxidante pela metodologia

³ Desse tópico do Capítulo 1, surgiu a ideia para o artigo publicado: CARDOSO, T.; MARQUES, C. et al. Characterization of lactobionic acid evidencing its potential for food industry application. Journal of Food Process Engineering, v. 42, n. 7, nov. 2019. (Apenas alguns resultados desse artigo serão utilizados aqui para explicar e corroborar resultados, pois na íntegra esses resultados entraram para outra Tese do grupo).

do radical ABTS•, foi a mais efetiva e expressou uma capacidade máxima de inibição de 56% na solução de LBA 400 mg.mL⁻¹. Nessa mesma concentração, a capacidade quelante do íon ferro (Fe²⁺), atingiu 54%, enquanto que a capacidade quelante do íon cálcio 15%, e a atividade antimicrobiana encontrada foi três vezes menor que o antibiótico controle. A análise térmica (TGA/DTG) do LBA explicitou quatro eventos de perda de massa, em temperaturas que propiciam várias aplicações em produtos alimentícios. Exemplificando, o LBA pode ser utilizado em alimentos para retenção de umidade, inibição bacteriana e manutenção de textura (CARDOSO et al., 2019b). Os resultados promissores deste estudo só reforçaram a necessidade de estudar o comportamento do LBA dentro de uma matriz alimentícia.

1.2.2 A raiz do yacon

Da língua Quechua, “yaku”, significa água. O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma planta com raiz tuberosa, de origem Andina e recorrência comum na América do Sul. Ela recebeu o título de alimento funcional principalmente devido seus componentes frutooligosacarídeos (FOS), inulina (ambos frutanos) e compostos fenólicos. Este alimento vem atraindo a atenção do mundo para seus benefícios uma vez que as pessoas estão cada vez mais interessadas em produtos nutracêuticos, ou seja, produtos que oferecem benefícios a saúde além dos nutricionais (DELGADO et al., 2013; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011).

1.2.2.1 Propriedades e composição da raiz do yacon

A água é o principal componente em sua composição, aproximando-se de 70%, possui de 0,3 a 3,7% de proteína e 619–937 kJ.kg⁻¹, valor calórico este considerado baixo. Expressivas quantidades de FOS podem ser encontrados na raiz, que em matéria seca variam de 40-70%. Este é o motivo pelo qual o consumo moderado de yacon é aconselhável apesar do alto teor de inulina e potássio – 230mg.100g⁻¹, pois se ingerido em excesso, este conteúdo de material não digerível pode causar aumento do fluxo intestinal (OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011; SANTANA; CARDOSO, 2008).

O consumo de inulina incentiva a produção de *Bifidobacteria* no cólon e também a absorção mineral durante a digestão, o que contribui para regular o colesterol, melhorar o sistema imunológico e aumentar a resistência do organismo contra infecções e alergias. Vaz-Tostes et al. (2014) comprovaram que produtos com farinha de yacon reforçam o sistema imunológico de crianças entre 2 e 5 anos. As raízes do yacon são usadas também com função

adoçante – menos calórico que os adoçantes mais utilizados – e para xaropes (DELGADO et al., 2013; VALENTOVÁ et al., 2003).

Estudos também indicam que os compostos presentes no yacon modulam a produção de insulina, aumentando sua quantidade no plasma, auxiliando pacientes insulino-resistentes e com diabetes tipo 2 (DELGADO et al., 2012; DIONÍSIO et al., 2015; GENTA et al., 2009). O aumento da insulina do plasma está relacionado com acréscimo de lipoproteínas como as lipases (HABIB et al., 2011), e também com a redução da produção de glicose por meio do aumento da atividade da mRNA glucoquinase (VALENTOVÁ et al., 2007). Os compostos fenólicos participam de todos estes efeitos (BÜYÜKBALCI; EL, 2008; CHEMLER et al., 2007) benéficos aos diabéticos, além do potencial antioxidante inerente.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou em 2015 uma diretriz para redução do consumo de açúcar, pois constatou-se que seu consumo em excesso é um dos principais motivos causadores de doenças não transmissíveis, como a diabetes tipo 2. Aproximadamente 68% das mortes por doenças no mundo, provém de doenças não transmissíveis, e portando a OMS faz uma recomendação enfática para que tanto adultos como crianças, reduzam a ingestão de açúcares livres a menos de 10% da ingestão calórica total diária (OMS, 2015). O yacon figura aqui como importante alternativa de alimento nutritivo com baixo teor calórico, não apenas para diabéticos, mas também para que a população em geral consiga cumprir a diretriz da OMS.

O número de brasileiros com diabetes cresceu consideravelmente nos últimos 10 anos, aumentando de 5,5% para 8,9% da população. Estima-se que em 2045 tenhamos 24 milhões de diabéticos no país. O controle e tratamento da doença é oferecido gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2018), e o consumo de yacon pode participar tanto do tratamento quanto da prevenção dessa doença.

Adicionalmente, ficou comprovado que o consumo da raiz do yacon aumenta a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta, os quais ajudam a prevenir câncer de cólon (MOURA et al., 2012). O princípio dessa atividade reside nos ácidos graxos de cadeia curta, que auxiliam no aumento da superfície de absorção do intestino, expandindo assim a absorção de minerais (ROBERFROID; CUMPS; DEVOGELAER, 2002).

Presentes nas raízes, os FOS são considerados frutanos (frutose β 2 $\rightarrow$ 1; 3-10 moléculas de frutose) do tipo inulina (*inulin-type*), os quais resistem às enzimas digestivas, e funcionam como fibras que passam quase intactos até o intestino com baixo valor calórico. Eles são considerados prebióticos pois são fermentados pelas bifidobactérias e lactobacilos (probióticos) presentes no trato gastrointestinal humano, afetando positivamente o trânsito alimentar, com

aumento da resistência a patógenos (OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011; PEDRESCHI et al., 2003; RODRIGUES; ASQUIERI; ORSI, 2014).

Além disso, as alegadas propriedades antioxidantes do yacon devem-se aos compostos fenólicos antioxidantes como os flavonoides, ácidos fenólicos (em especial o ácido clorogênico – com aproximadamente 50 mg.kg⁻¹) e o aminoácido triptofano (com aproximadamente 15 mg.kg⁻¹), que agem neutralizando os radicais livres, evitando o stress oxidativo das células (LACHMAN; FERNÁNDEZ; ORSÁK, 2003).

Takenaka et al. (2003) conseguiram isolar 3 compostos ésteres de ácido cafeico das raízes do yacon, importantes compostos fenólicos antioxidantes solúveis em água, e são eles: o ácido 2,4 ou 3,5-dicafeoilaltrárico; ácido 2,5- dicafeoilaltrárico; ácido 2,3,5 ou 2,4,5-tricafeoilaltrárico. Estes ácidos possuem também atividade hipoglicêmica segundo estudos em ratos (GENTA et al., 2010). É interessante ressaltar que cada genótipo do yacon produz diferentes composições (VALENTOVÁ et al., 2006), e consequentemente, diferentes teores dos compostos bioativos mencionados.

Devido a todas essas propriedades até mesmo o yacon em cápsulas é regulamentado pela ANVISA para comercialização como nutracêutico (Registro ANVISA nº 638010156). Muitos estudos sobre yacon com humanos provaram seus benefícios e segurança (GENTA et al., 2005, 2009; VALENTOVÁ et al., 2008). Sua toxicologia foi historicamente estabelecida, pois o yacon vem sendo utilizado pelo povo dos Andes há séculos. Todas essas propriedades, principalmente a antimicrobiana, fornecem ao yacon, uma vantagem durante a sua produção, com zero ou pouco uso de pesticidas (DELGADO et al., 2013).

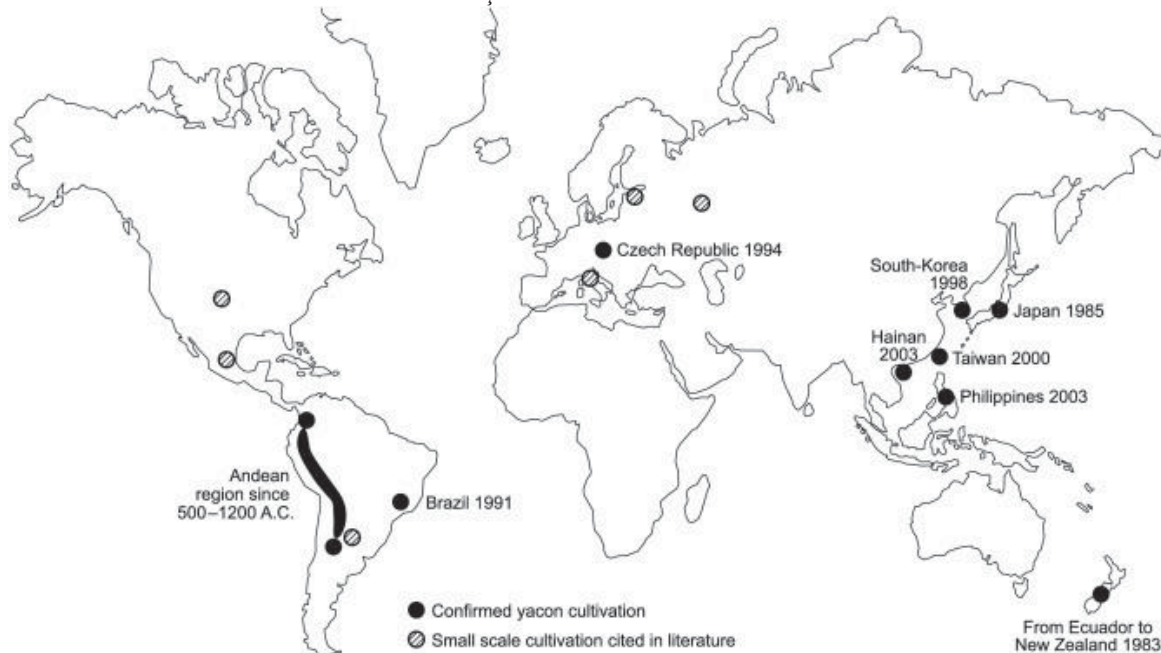
1.2.2.2 Produção, variedades e aplicações do yacon

Com uma produção relativamente simples, rendimento (ton.ha⁻¹) superior a outras plantas semelhantes e algumas variedades de espécies, o yacon é um alimento com potencial para dar lucro a pequenos e médios produtores. Até mesmo na agricultura orgânica é uma cultura com potencial, e além da obtenção da raiz in natura, é possível transformá-la em derivados (DELGADO et al., 2013; GRAEFE et al., 2004; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011).

Notícias de 2017 e 2015 mostram que pequenos e médios produtores vem apostando no cultivo do yacon até mesmo no Brasil, devido seu apelo funcional e à procura da raiz. A procura é promovida em grande parte por consumidores com diabetes tipo 2, já que o consumo regular do tubérculo auxilia no controle da glicemia (NOSSO CAMPO, 2015; TV TEM, 2017).

O yacon consiste em uma planta que prefere o clima subtropical, altitudes consideráveis, de 800-2800 metros, e apesar da origem Andina, é encontrada além da América do Sul (Figura 2) também também no Japão, China, República Tcheca, França (*poire de terre*), Rússia e EUA (*yacon strawberry*), e cresce tanto em climas quentes quanto frios (LACHMAN; FERNÁNDEZ; ORSÁK, 2003; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011).

FIGURA 2 – MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DO YACON DESDE SUA ORIGEM NOS ANDES



FONTE: OJANSIVU et al., (2011).

As raízes podem medir de 15-20 cm de comprimento e uma planta pode produzir em torno de 10 kg de raízes, as quais aparecem como desmembramentos de um rizoma central, ou como raízes independentes ao redor do rizoma central. As variedades mais conhecidas são das cores marrom, creme (Figura 3), roxa e rosa e elas podem ser cultivadas em vários períodos do ano desde que tenha água disponível (LACHMAN; FERNÁNDEZ; ORSÁK, 2003; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011).

O Ministério de Assuntos Exteriores da Europa informou por meio do CBI (*Centre for the Promotion of Imports*) – Centro de apoio a importação, que em 2014 a entrada do yacon foi permitida pela União Européia, através da empresa Britânica Alara. A exportação do yacon e seus derivados da América do Sul para a Europa é crescente, aumentando 53% por ano quando comparada com as 22 toneladas que chegaram a Europa em 2015. Grande parte é exportada já na forma de xarope para fins de otimização do transporte e durabilidade. Os preços demonstram a qualidade do produto, onde 1 kg do xarope de yacon chega a custar 105 euros no Reino Unido.

FIGURA 3 – RAIZES DO YACON; A) RECENTEMENTE COLHIDAS, B) RAIZES LIMPAS E C) RAIZES CORTADAS APÓS DOIS MINUTOS, EVIDENCIANDO O ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO



a)

b)

c)

FONTE: A autora (2019).

O Peru é o país que mais exporta essa matéria-prima, que chega principalmente na forma de xarope para substituir os adoçantes existentes, e a venda se concentra especialmente no noroeste da Europa. Comparando com a venda de outros adoçantes alternativos como a Stevia, o xarope de yacon ainda não está estabelecido no mercado europeu, contudo, com crescente potencial, pois promove o balanceamento da microbiota intestinal e principalmente visando o consumidor diabético (CBI, 2016).

No Brasil, a espécie foi introduzida em meados de 1989, na região de Capão Bonito interior de São Paulo, por imigrantes japoneses, que utilizam suas folhas e raízes nos tratamentos contra diabetes e colesterol. O rendimento encontrado em terras brasileiras é de 35-80 ton.ha⁻¹ para raízes e 1 ton.ha⁻¹ para folhas desidratadas (VILHENA; CÂMARA; KAKIHARA, 2000), com um ciclo de aproximadamente 12 meses entre plantio e colheita, onde uma caixa de 10 kg custou em torno de R\$100,00 em 2019 (CEASA RJ, 2019).

Existem diversos derivados do yacon, dentre os mais utilizados existem os “chips”, o xarope e a farinha. As raízes são lavadas, a casca é retirada, posteriormente transformando em chips, ou cubos, ou prensadas e filtradas para suco e concentradas para xarope além de moídas e secas para farinha (DELGADO et al., 2013; GRAEFE et al., 2004; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011).

Alguns produtos estão sendo desenvolvidos, estudados e enriquecidos com derivados do yacon, como pães de forma (ROLIM et al., 2010), apresuntado (CONTADO et al., 2015), sorvete (PARUSSOLO et al., 2017) e bolos (MOSCATTO et al., 2006; ROSA et al., 2009). Os estudos citados concluíram que os derivados do yacon tem grande potencial de aplicação em

alimentos, com aceitabilidade semelhante às formulações controle, sem o yacon. Existem escassos registros de utilização do yacon fresco na culinária devido ao escurecimento enzimático, ocasionado pelas enzimas polifenoloxidasas (PPOs) sobre o teor de compostos fenólicos presentes (DELGADO et al., 2013).

1.2.2.3 As polifenoloxidasas no yacon

As raízes do yacon, conhecidas pela presença expressiva de compostos fenólicos, carrega também a inconveniência sensorial do escurecimento enzimático e/ou oxidativo, resultado da polimerização de fenóis catalisada pelas oxirredutases, como a polifenoloxidase (PPO). O substrato do escurecimento, vem dos vacúolos celulares e as enzimas envolvidas, as quais estão normalmente ligadas nas membranas celulares e de organelas. A reação ocorre apenas com o contato desses dois fatores, enzima e compostos fenólicos, e também requer a presença de oxigênio como aceptores de hidrogênio. O contato que propicia o escurecimento ocorre principalmente devido ao processamento e injúrias do tecido vegetal (CHISARI; BARBAGALLO; SPAGNA, 2007; TOIVONEN; BRUMMELL, 2008; VASCONCELOS et al., 2015).

As o-quinonas são os produtos primários da oxidação fenólica que posteriormente se polimerizam em compostos pigmentados marrons, pretos e vermelhos. Consequentemente a quantidade de pigmentos formados é proporcional a quantidade de fenólicos da planta (YORUK; MARSHALL, 2003). Para evitar o escurecimento pode-se regular o oxigênio, e adicionar agentes químicos como ácidos, desacelerando reações, ou utilizar o branqueamento por exemplo, para inativar as enzimas. Combinar tratamentos físicos (calor) e químicos (ácidos) também são uma alternativa inteligente (PEREIRA et al., 2013; REIS; LENZI; MASSON, 2012; RODRIGUES et al., 2013), pois diminui a severidade de ambos.

Em yacon minimamente processado, alguns tratamentos mostram-se efetivos para evitar o escurecimento, prolongando para até 17 dias a vida útil, com a utilização de ácidos orgânicos para esse fim, como o ascórbico, cítrico e tartárico (VASCONCELOS et al., 2015). A literatura também aponta temperaturas de inativação das PPOs no yacon, (YA; QI-LONG, 2014) de 90 °C por 240 segundos, como método físico. Rodrigues, Asquieri e Orsi (2014) determinaram a melhor temperatura de atividade da PPO do yacon em 20 °C, e a pior em 90 °C, com o melhor pH em torno de 7,0.

Neves e Silva (2007) encontraram que a maior atividade das PPOs do yacon acontece com os substratos catecol e metil-catecol, em comparação com ácido cafeico e clorogênico, em

uma temperatura em torno de 30 °C e pH 6,5-7,0. O inibidor de maior eficiência, reportado pelo estudo de Neves, é o metabissulfito, porém eles são conhecidos seus possíveis efeitos deletérios a saúde. Contudo, o metabissulfito consegue um poder inibidor até 5 vezes maior que os ácidos orgânicos testados, o como o ascórbico e o benzoico.

Lago e Noreña (2014) estudaram a cinética do branqueamento de suco de yacon, e a polifenoloxidase diminui sua atividade de 90 U.mL⁻¹ para 3 U.mL⁻¹ com a simples adição de ácido cítrico (1%), e posteriormente ainda reduziu-se a 1 e 0,5 U.mL⁻¹ após branqueamento do suco a 90 e 100 °C respectivamente. Vale ressaltar que a degradação de compostos fenólicos não acarreta em apenas mudança de cor. Outra mudança importante é a perda nutricional, dos benefícios atribuídos aos compostos fenólicos.

1.2.2.4 Bebidas de yacon

Como mencionado por Delgado et al. (2013) o yacon pode ser utilizado como bebida refrescante, extraíndo o suco da raiz, além de ingerí-lo em pedaços frescos. Entretanto, raros são os relatos de estudos do suco de yacon sem mistura com outro suco. Hondo et al. (2000) desenvolveram um suco de yacon desodorizado e clarificado para aproveitar os constituintes do yacon em um produto com vida útil estendida. Hondo, Okumura e Yamaki (2000) fermentaram este suco produzindo vinagre de yacon. E Lago e Noreña (2014) estudaram a cinética do branqueamento de suco de yacon.

Quinteros (2000) testou que a combinação do suco de yacon com o de maracujá permitiu que a vida útil fosse estendida em até 6 meses. Entretanto, o fator que mais se destacou foi o escurecimento durante o armazenamento. O branqueamento do yacon, seja por vapor ou por imersão, reduziu o escurecimento do suco posteriormente (QUINTEROS, 2000). Apesar da crescente demanda aos alimentos sem processamento, certamente seu armazenamento é limitado. Hondo et al. (2000) sugeriram adição de ácido ascórbico (vitamina C) ou suco de limão para evitar o escurecimento, mas também destacaram possibilidade de mudança nas propriedades sensoriais.

Dionísio et al. (2015) confirmaram o potencial do yacon na hipoglicemia em ratos, administrando a bebida caju-yacon, com 50% de polpa de caju e 50% de extrato de yacon. Dionísio et al., (2017) analisaram a vida útil dessa bebida, que foi limitada a 90 dias pelo desenvolvimento de fungos. No entanto, não foi mencionada a extensão do escurecimento dos sucos analisados.

Manzoni et al. (2012) também desenvolveram uma bebida de soja-yacon (60:40) para testar adoçantes e sua aceitação, e encontraram uma bebida de baixo teor calórico, com quantidade considerável de FOS e boa aceitação (6 em escala de 9). Franco et al., (2015) foram além no estudo do suco, eles o desidrataram e analisaram suas propriedades de dissolução. O suco foi preparado mecanicamente e adicionado de metabissulfito de potássio (0,3%) para evitar a oxidação antes da secagem.

Padilha et al. (2017) prepararam uma polpa de yacon concentrada a 25 °C para adicionar em iogurte e processou o yacon com 0,5% de ácido ascórbico devido ao escurecimento. O aumento na porcentagem de polpa de yacon adicionada, diminuiu a intenção de compra e apresentou efeito inverso à adição de açúcar mostrando que o escurecimento não é apreciado pelos consumidores.

Em suco fermentado de yacon, envelhecido por um ano, notou-se que os FOS que inicialmente eram 32%, diminuiu para 0,46% no fermentado, ou seja, as leveduras os metabolizaram, e essa quantidade ainda diminuiu com o envelhecimento, o que não é interessante para o apelo nutricional. A aceitação foi significativamente inferior quando comparada á vinhos brancos. O preparo e formulação do suco fermentado é protegido por patente (BRANDÃO et al., 2014) porém mesmo assim é possível notar que fermentar o suco de yacon pode não ser interessante do ponto de vista nutricional.

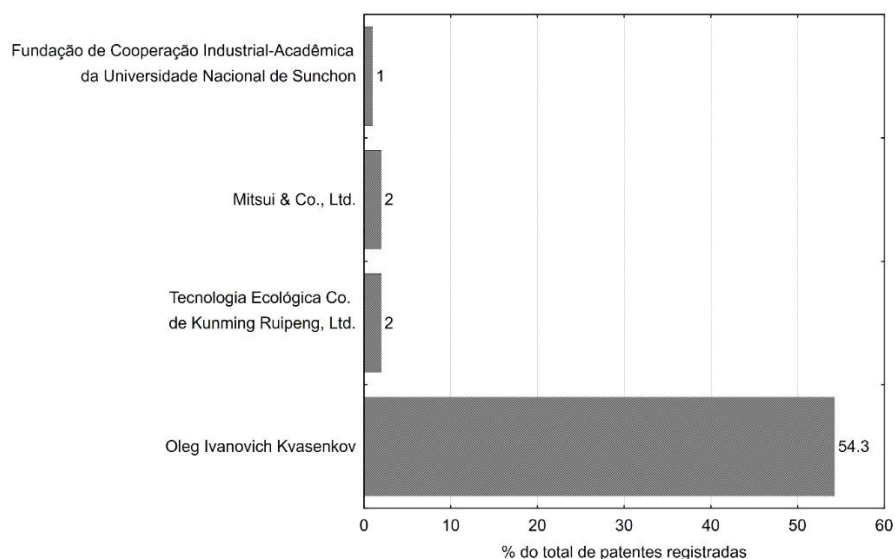
1.2.2.5 Patentes e estatísticas de pesquisa do yacon

As patentes que envolvem o yacon começam a ser encontradas na década de 90, quando o Japão começou a estudar a raiz, e seus possíveis produtos. A primeira enviada em 1990 e aprovada em 1992 sugere uma bebida de yacon aquecida com água para evitar escurecimento, preferivelmente 80-100 °C por 3-30 min (HISADA; NAWATA; NAWATA, 1992).

Oleg Ivanovich Kvasenkov é responsável por mais de 50% das patentes de yacon que estão relacionadas com bebida, drink ou suco. De nacionalidade russa, ele começou a registrar os estudos de yacon em 1995.

Os países que dominam as patentes são: Japão, China e Rússia (Gráfico 3). As patentes japonesas entram em acordo sobre o tratamento do suco de yacon, com ácido ascórbico e posterior pasteurização (85 °C por 3 min) para evitar oxidação e estabilizar as bebidas, além de utilização de gelatina/terra diatomácea para auxiliar a clarificação, e descascamento embaixo da água (MURAKAMI et al., 1998; YAMAMORI, 1998).

GRÁFICO 3 – RESPONSÁVEIS POR PATENTES DO YACON RELACIONADO COM BEBIDA, DRINK E SUCO (EMPRESAS E PESQUISADOR)



Os valores representam a porcentagem que a empresa registrou do total de patentes do yacon, relacionadas a bebidas/drinks. FONTE: Google Patents, (2019). Gráfico: A autora (2020).

Aproxima-se de 6 mil o número de patentes que mencionam o yacon no banco de dados do Google, dos projetos mais antigos (1990) que incluem geléia de yacon, extração de FOS, produção de adoçante natural, yacon desidratado, chá de yacon, cosméticos que utilizam yacon como agente umidificador; até os mais recentes (2017) que abrangem também cosméticos, vinho de yacon, cera de yacon, liquor de arroz-yacon entre outros.

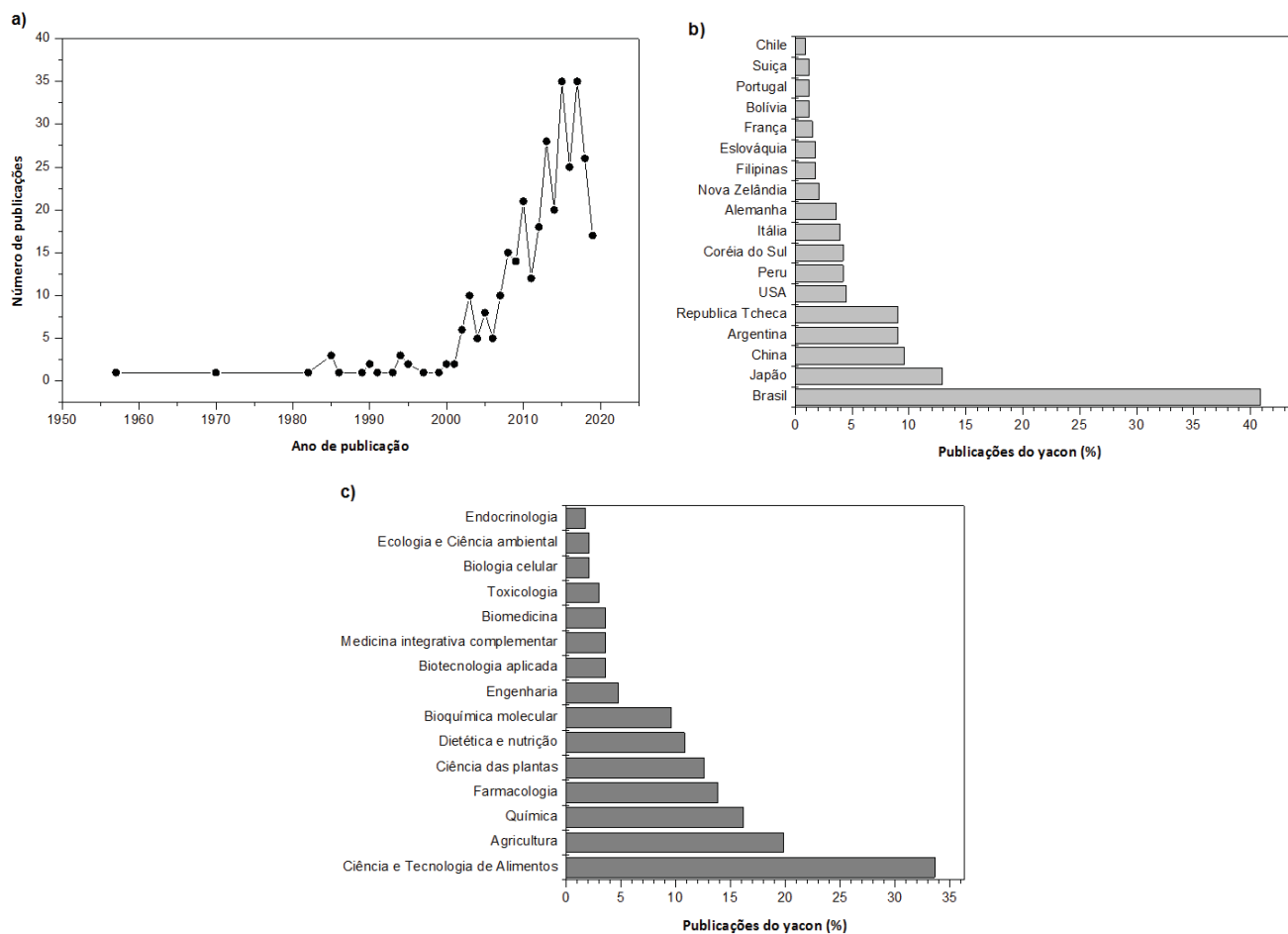
Quanto às estatísticas de pesquisa sobre yacon, desde 1957 a plataforma de pesquisa Scopus (SCOPUS, 2019) apontou 333 itens de pesquisa com “yacon” no título (Gráfico 4a), seu nome científico *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob., ou mesmo o nome científico anterior, o basíônimo *Polymnia sonchifolia* Poepp. Também tem como sinônimo botânico *Helianthus esculentus* Warsz. Ex Otto & Dietr. e *Polymnia edulis* Wedd. (THE PLANT LIST, 2019). Um aumento significativo nas publicações ocorreu após o ano 2000, com 10 publicações em 2003 e 21 em 2010. O pico máximo foi atingido em 2015/2017 com 35 publicações por ano e 2019 somou 17 trabalhos sobre o assunto.

O país que lidera as publicações yacon é o Brasil (40,84%), seguido pelo Japão (12,91%), China (9,61%), Argentina (9,01%) e República Tcheca (9,01%). O Gráfico 3b representa os países com três ou mais publicações sobre yacon. Surpreendentemente, o Peru, o maior produtor, não é o maior publicador do assunto.

Ciência e Tecnologia de Alimentos (Gráfico 3c) é a área onde a maioria das publicações da yacon está concentrada (112/333), seguida pelo tópico Agricultura (19,82%), Química

(16,22%), Farmacologia (13,81%), Ciências das plantas (12,61%), Dietética nutricional (10,81%) e Biologia molecular (9,61%). Todos estes campos destacam a multidisciplinaridade do yacon, como matéria-prima para produzir derivados e extratos, e suas aplicações como nutriente com benefícios à saúde, uma conhecida planta nutracêutica.

GRÁFICO 4 – ESTATÍSTICAS DE PESQUISA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO YACON; A) PRODUÇÃO CIENTÍFICA POR ANO; B) POR PAÍS C) E POR ÁREA CIENTÍFICA.



FONTE: Scopus (2019); Gráfico: A autora (2020).

CAPÍTULO 2 – Objetivos e escopo do documento

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido lactobiônico na vida útil, manutenção dos compostos bioativos, potencial prebiótico e escurecimento do suco de yacon durante o armazenamento refrigerado de 180 dias.

2.2 Objetivos específicos

a) Analisar previamente os efeitos do branqueamento do yacon, imersão das raízes em ácido cítrico anteriormente à extração do suco, e da adição de LBA no suco, na manutenção de compostos bioativos e cor durante 48 h de refrigeração;

b) Determinar a concentração ideal de ácido lactobiônico para que se obtenha um suco de yacon com estabilidade de cor e compostos bioativos, durante 48 h de armazenamento refrigerado;

c) Determinar qual dos ácidos alimentícios se destaca na conservação do suco de yacon (48 h sob refrigeração) e manutenção de seus compostos bioativos, comparando a ação dos ácidos ascórbico, cítrico, tartárico, málico além do LBA;

d) Comparar as propriedades do LBA com o ácido de melhor desempenho na fase inicial do estudo, quanto a importância delas para a indústria de alimentos;

e) Avaliar a influência do ácido lactobiônico nas propriedades do suco de yacon no período de armazenamento refrigerado de 180 dias, quanto a manutenção dos compostos bioativos, potencial prebiótico e cor, quando comparado com o suco sem acidulante e adicionado com o ácido que se destacou na etapa anterior;

f) Avaliar o potencial prebiótico do suco de yacon armazenado sob refrigeração por 180 dias, com e sem LBA;

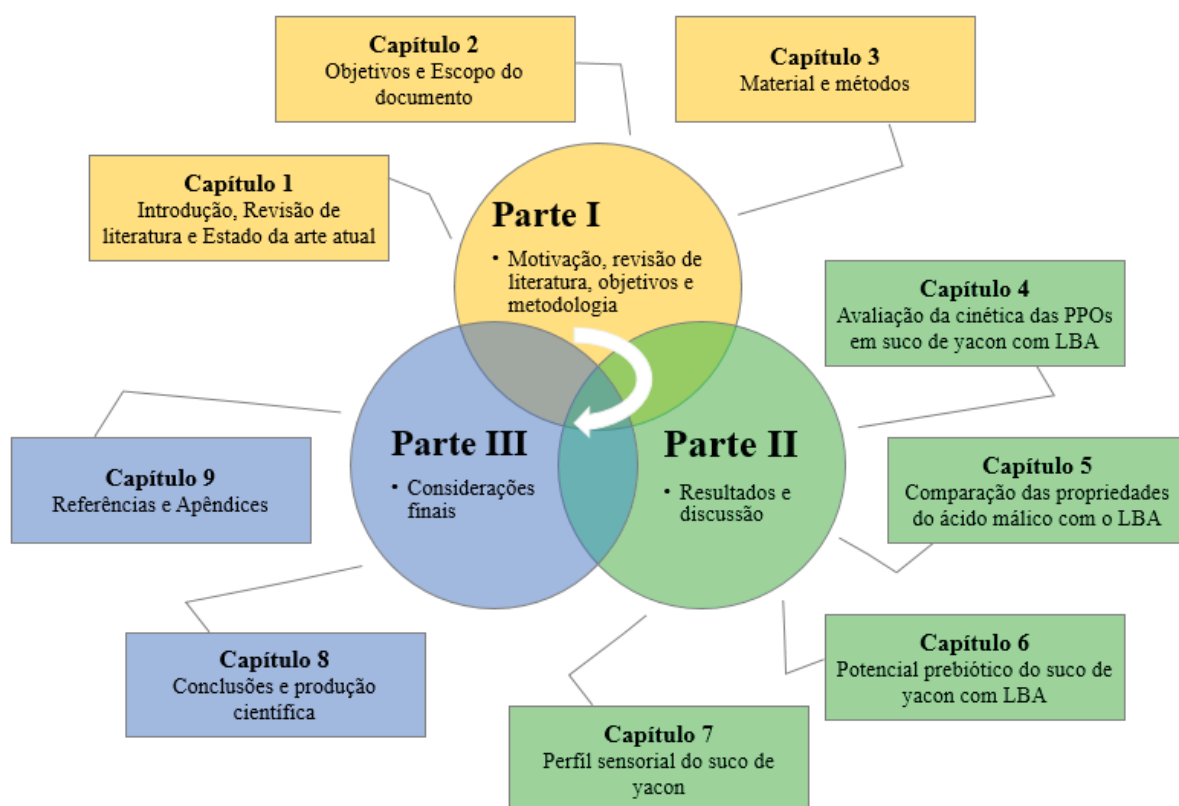
g) Determinar um perfil sensorial estimado do suco de yacon com LBA correlacionando os resultados da metodologia descritiva sensorial conhecida como Perfil Flash, - realizada para os sucos com ácido exceto LBA, e sem acidulante - com os resultados da análise do suco de yacon com LBA, investigado por nariz eletrônico, por meio de análise de componentes principais (PCA) e clusters (HCA).

2.3 Escopo do documento

Para facilitar o entendimento sobre a organização deste documento de Defesa de Doutorado, este tópico, juntamente com a Figura 4, devem ser avaliados.

A Parte I, trouxe a revisão de literatura, sobre os temas principais abordados neste trabalho, divididos em ácido lactobiônico e yacon. Mais precisamente, informações gerais sobre o LBA, sua estrutura química, toxicologia, produção mundial, aplicações encontradas em publicações e em patentes, além das propriedades que o tornam de interesse para a indústria de alimentos. Logo em seguida, foi levantada a literatura sobre a planta yacon, focando na raiz, matéria-prima utilizada nas investigações sobre o suco de yacon. Destacou-se a composição da raiz de yacon, sua produção, característica das polifenoloxidasas presentes, as quais geram a problemática do suco, o seu escurecimento. Sobre ambos os assuntos, foram apresentadas as estatísticas de pesquisa, as quais auxiliam na justificativa sobre o motivo de unir estes dois assuntos em uma pesquisa.

FIGURA 4 – ESQUEMA DE ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO



FONTE: A autora (2021).

No Capítulo 3 foram relatados metodologias e materiais utilizados no estudo. Começando a parte II, de resultados e discussão, quatro Capítulos descreverão quatro publicações distintas, sendo que três delas já estão finalizadas e publicadas, e uma já enviada para publicação.

O Capítulo 4 corresponde ao processo de encontrar as melhores condições de tratamento do suco de yacon para conservar sua cor e compostos bioativos. O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar a influência de tratamentos combinados (branqueamento, pré-tratamento com ácido) e LBA no suco de yacon refrigerado (48 h). Em segundo lugar, o LBA foi comparado com os ácidos cítrico (CA), málico (MA), tartárico (TA) e ascórbico (AA), investigando a cinética das polifenol oxidases (PPOs) e o armazenamento (48 h) do suco. As condições combinadas que se destacaram, foi o branqueamento a vapor + LBA 1%. Os resultados enfatizaram que os ácidos LBA, MA e TA, são capazes de manter os parâmetros do suco de yacon. Da mesma forma, o MA e o LBA destacaram-se desabilitando as PPOs. Esta foi a primeira vez que o LBA foi testado em suco refrigerado e demonstrou um potencial significativo para preservação de cor e compostos bioativos, acidificação e potencial para enriquecimento de alimentos.

Dos resultados do Capítulo 4, alguns questionamentos ficaram pendentes sobre o ácido málico, que possui diversas propriedades alegadas, assim como o LBA, porém sem resultados quantitativamente avaliados na literatura. Portanto, diante do resultado positivo sobre o ácido málico no Capítulo 4, o Capítulo 5 teve como objetivo, avaliar grande parte das propriedades físico-químicas do ácido málico, sólido e em solução, que poderiam ser úteis para a indústria de alimentos entender seu real potencial, comparando com os mesmos resultados realizados para o LBA no artigo publicado: *Characterization of lactobionic acid evidencing its potential for food industry application. Journal of Food Process Engineering*, v. 42, n. 7, nov. 2019.

Como foi abordado no Capítulo 5, o ácido málico exibiu uma alta solubilidade em água, maior que o LBA. As bactérias testadas foram inibidas pelo DL-ácido málico a 10% ou mais concentrado, de modo superior ao LBA. As atividades quelantes e antioxidantes apresentaram resultados expressivos mesmo na solução a 1%, assim como o LBA para o íon ferro. Os géis de pectina com ácido málico apresentaram estrutura mais forte e menos sinérese do que os géis de ácido cítrico, porém ambos ficam abaixo dos resultados encontrados para o LBA. As propriedades quelantes de cálcio, texturizante e antioxidantes do ácido málico foram confirmadas. Assim, ficou admitido que o ácido málico tem potencial para ser aplicado em produtos de secos e em pó, bebidas fortificadas, itens congelados e refrigerados, óleos, géis de pectina, balas duras e moles e biofilmes, devido a todas as características encontradas e

quantificadas. Enquanto, o LBA se aplicaria em um nicho diferente, de produtos em que se admite absorção de umidade, para manter textura, géis, também em bebidas fortificadas, lácteos e cárneos.

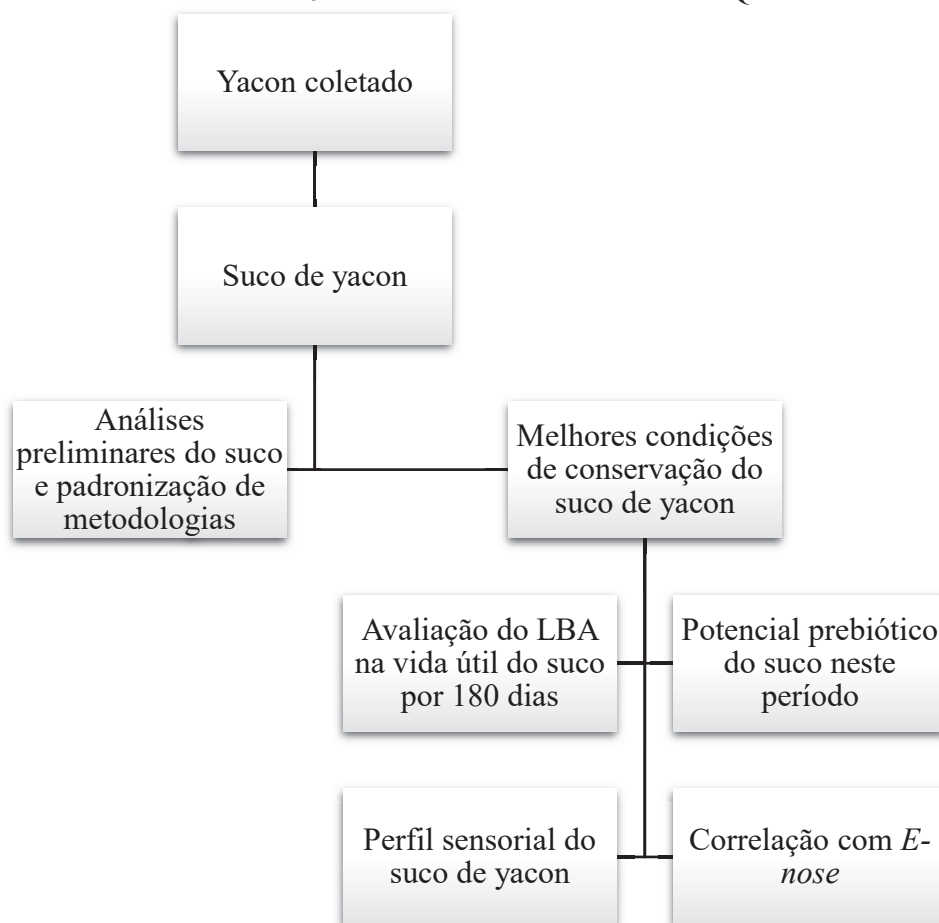
Dos melhores tratamentos do Capítulo 4, os resultados que foram apresentados no Capítulo 6, exibiram o potencial prebiótico do suco de yacon com LBA, ácido málico e sem ácido conservante, bem como suas estabilidades durante o armazenamento refrigerado de 180 dias. O suco foi limitado a 120 dias de armazenamento refrigerado, sendo que a amostra Controle, sem ácidos atingiu o limite de Bolores e Leveduras no dia 60, e com ácidos, no dia 105. Os ácidos málico e LBA estabilizaram as mudanças de cor do suco de yacon durante 120 dias, e quase dobraram a vida útil do suco de yacon. O resultado indicou que o suco de yacon tem potencial prebiótico e pode ser considerado uma bebida funcional prebiótica, durante um armazenamento de longo prazo, por pelo menos 120 para os probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, e 105 dias para o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

As mesmas amostras de suco que se destacaram no Capítulo 4, seguiram para levantamento do perfil sensorial. A metodologia sensorial descritiva moderna, conhecida como Perfil Flash (*Flash Profile*), foi utilizada para tal fim. Os resultados apresentados no Capítulo 7 relatam a terminologia levantada para o perfil sensorial do suco de yacon. Além disso, foi possível estimar o perfil sensorial do suco de yacon adicionado de LBA, sendo este avaliado apenas por *E-nose* (nariz eletrônico), e correlacionado com os dados levantados por Perfil Flash. A Parte III conta com os Capítulos 8 e 9, sendo eles sobre a produção científica, ligada a este estudo, dentro do grupo de pesquisa do LABTECAL e por fim o referencial utilizado.

CAPÍTULO 3 – Material e métodos

O fluxograma da Figura 5 indica um panorama geral da execução projeto, que foi realizado nas diversas etapas descritas a seguir. A maioria das análises foram realizadas na Usina Piloto B e laboratório de Análise de Alimentos (LABTECAL) do Departamento de Engenharia Química, no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná – UFPR/PR, Campus de Curitiba. Análises como TGA/DTG e DSC foram realizadas na Central analítica Usina Piloto A, MEV no Centro de microscopia e DRX/Ponto de fusão no Departamento de Química, todos dentro da UFPR, Centro Politécnico. O ensaio com o *E-nose* foi realizado nas instalações da UTFPR – Campo Mourão.

FIGURA 5 – DIAGRAMA DE FLUXO DA PESQUISA



FONTE: A autora (2021).

3.1 Preparo da matéria-prima

3.1.1 Obtenção do yacon

As raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) foram obtidas na Fazenda Experimental Canguiri da UFPR⁴, na cidade de Pinhais-PR, com primeira coleta realizada no mês de agosto de 2018 e segunda coleta realizada em junho de 2019. As raízes foram lavadas e armazenadas sob refrigeração ($8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até 30 dias antes da extração do suco. A seleção da matéria-prima considerou a uniformidade das raízes, sanidade (ausência de danos mecânicos e doenças aparentes) em avaliação qualitativa visual.

3.1.2 Caracterização da raiz de yacon

A caracterização química da matéria-prima e do produto elaborado foi realizada por meio das análises fundamentais segundo AOAC - *Association Of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2005) para umidade, cinzas, proteína e para lipídios (Soxlet - 1879). O teor de carboidratos foi obtido por diferença e o teor de sólidos solúveis por refratômetro de bancada (Requipal®), na unidade de °Brix.

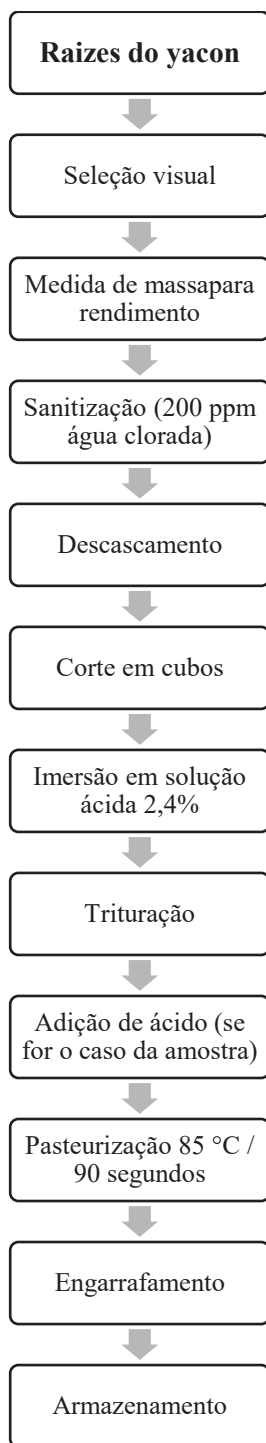
O valor calórico foi calculado a partir das concentrações de proteína, lipídios e carboidratos (MERRILL; WATT, 1973). Foram considerados os fatores de conversão para proteína 4 kcal.g⁻¹, carboidratos 4 kcal.g⁻¹ e para lipídios 9 kcal.g⁻¹.

3.1.3 Extração do suco e rendimento

Em procedimento adaptado (Figura 6) de Dionísio et al. (2013) as raízes foram sanitizadas em água clorada (200 ppm de cloro ativo), descascadas manualmente e cortadas em cubos de aproximadamente 1,5 cm³, os quais foram imediatamente imersos solução ácida (ácido cítrico 2,4%, por oito min) e, em seguida, foi retirada a água em excesso. O yacon foi triturado em triturador doméstico tipo liquidificador (Mondial©, Brasil), com lâminas tipo faca de aço inoxidável e peneira (abertura de 0,5 mm), para separação dos sólidos.

⁴ Rua Ivone Pimentel, 1000 – CEP 83.326-730, Pinhais – PR. 25°23'12.3"S 49°07'33.3"W.

FIGURA 6 – DIAGRAMA DE FLUXO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SUCO DE YACON



FONTE: Adaptado de DIONÍSIO et al., (2013).

O suco de yacon sem tratamento ácido foi acondicionado em garrafas de vidro de 200 mL, previamente esterilizadas com calor úmido e recobertas de folhas de papel alumínio para não haver interferência da luz. Os ácidos foram adicionados logo após a trituração. A pasteurização foi realizada logo após esta etapa. As garrafas âmbar foram então fechadas com

tampas igualmente esterilizadas, e armazenadas sob refrigeração ($8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises.

O rendimento em suco do yacon processado foi determinado por meio da Equação 1.

$$\frac{MI - MS}{MI} \times 100 = \text{rendimento da extração (\%)} \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo MI a massa inicial das raízes com casca e MS a massa de sólidos recuperada da centrifugação.

3.2 Determinação das condições de conservação suco de yacon

A literatura já estabeleceu alguns pré-tratamentos para evitar o escurecimento de suco de yacon, porém nenhum deles relacionou estes tratamentos com a adição de LBA para fins conservativos e de enriquecimento. A imersão dos cubos de yacon em ácido cítrico 2,4% (8 min), e a pasteurização do suco a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 segundos (DIONÍSIO et al., 2013, 2015, 2017; QUINTEROS, 2000) já possuem comprovada eficiência na conservação de cor e foram utilizadas aqui sem variação e otimização de parâmetros.

Em relação ao LBA, nenhum trabalho abordou seu uso na conservação do suco de yacon até o momento. Assim, o objetivo da primeira parte deste estudo foi avaliar a eficiência do ácido lactobiônico, dentre as condições combinadas de conservação, na preservação do suco de yacon, investigando a atividade de polifenoloxidase e compostos bioativos no armazenamento refrigerado. Os tratamentos ácidos (pré-tratamento e ácido diretamente ao suco após a pasteurização), associados aos métodos de branqueamento (imersão e vapor), foram investigados. Posteriormente, na melhor combinação entre branqueamento e tratamento ácido encontrada, foi realizada a cinética das PPOs por meio de cinco ácidos testados, os conhecidos ácidos alimentícios: Ácidos málico, ascórbico, cítrico e tartárico; além do LBA. As análises utilizadas para acessar a estabilidade do suco foram, além da cinética das PPOs, a atividade antioxidante (DPPH e ABTS), compostos fenólicos totais, pH, acidez, sólidos solúveis e a estabilidade de cor durante 48 horas após a extração do suco, sabendo da rápida velocidade de reação das PPOs.

3.2.1 *Planejamento experimental*

Um delineamento inteiramente casualizado foi estabelecido em um esquema fatorial de 3 fatores para determinar os tratamentos combinados. Foram avaliados: 2 níveis de pré-tratamento (apenas 2,4% de ácido cítrico e sua ausência); Branqueamento em 3 níveis (nenhum, vapor e imersão) e o tratamento com LBA da mesma forma com 3 níveis (0%, 0,5% e 1%); totalizando 18 tratamentos e medições variando no tempo (inicial, 24 h e 48 h) totalizando 54 ensaios. A quantidade máxima de LBA (1%) testada foi baseada em um estudo semelhante de Lago e Noreña (2014), que utilizaram 1% de ácido cítrico diretamente em suco de yacon para evitar o escurecimento. A Tabela 1 esclarece o planejamento experimental na combinação de tratamentos utilizado. De modo a facilitar o entendimento e evitar o retorno a lista de abreviaturas, os códigos usados nesta parte foram:

- Controle - Suco de yacon sem qualquer tratamento;
- PT - Suco de yacon com raízes imersas em ácido cítrico a 2,4%;
- V - Suco de yacon com branqueamento a vapor;
- I - Suco de yacon com branqueamento por imersão;
- PTV - Suco de yacon com PT + branqueamento a vapor;
- PTI - Suco de yacon com PT + branqueamento por imersão;
- A05 - Suco de yacon com LBA 0,5% adicionado antes da pasteurização;
- PTA05 - Suco de yacon com PT + LBA 0,5% adicionado;
- VA05 - Suco de yacon com branqueamento a vapor + LBA 0,5% adicionado;
- IA05 - Suco de yacon com branqueamento por imersão + LBA 0,5% adicionado;
- PTVA05 - Suco de yacon com PT + branqueamento a vapor + LBA 0,5% adicionado;
- PTIA05 - Suco de yacon com PT + branqueamento por imersão + LBA 0,5% adicionado;
- A1 - Suco de yacon com LBA 1% adicionado antes da pasteurização;
- PTA1 - Suco de yacon com PT + LBA 1% adicionado;
- VA1 - Suco de yacon com branqueamento a vapor + LBA 1% adicionado;
- IA1 - Suco de yacon com branqueamento por imersão + LBA 1% adicionado;
- PTVA1 - Suco de yacon com PT + branqueamento a vapor + LBA 1% adicionado;
- PTIA1 - Suco de yacon com PT + branqueamento por imersão + LBA 0,5% adicionado;

TABELA 1 – Planejamento experimental da combinação de tratamentos para o suco de yacon

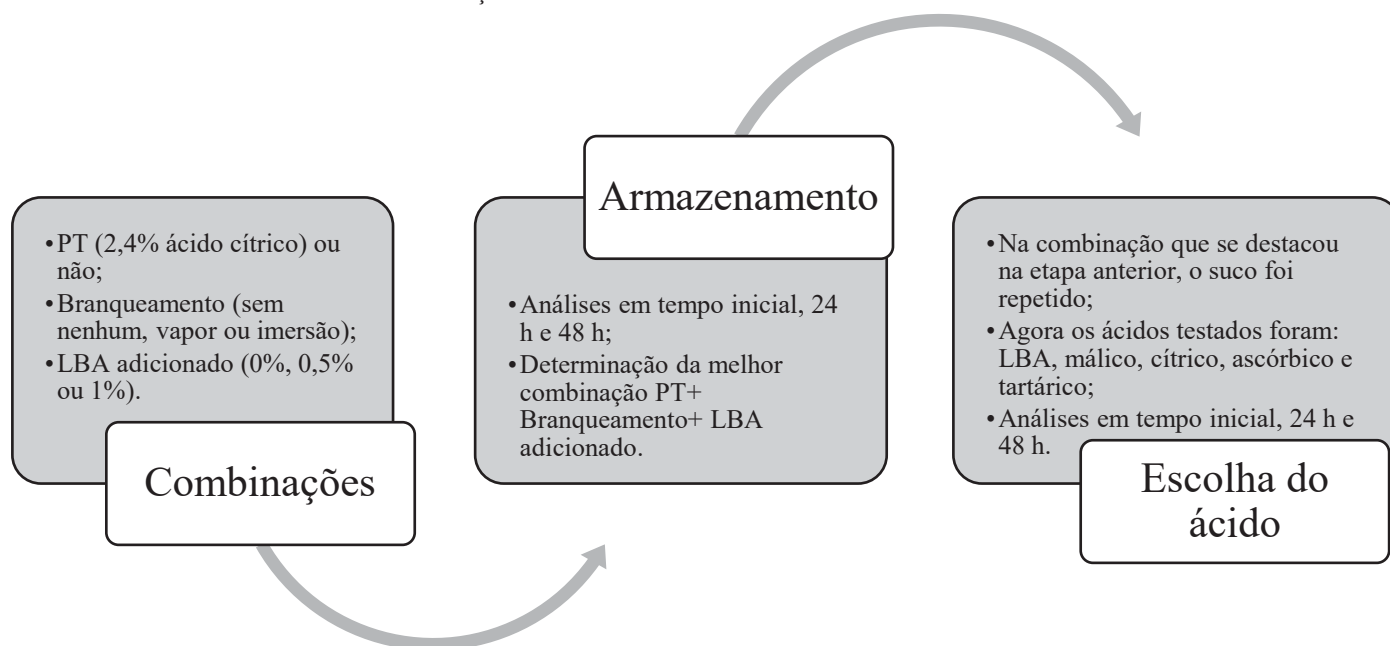
Amostra	Pre-tratamento Ácido cítrico (%)	Branqueamento	LBA adicionado (%)
Controle	0	-	0
PT	2,4	-	0
V	0	Vapor	0
I	0	Imersão	0
PTV	2,4	Vapor	0
PTI	2,4	Imersão	0
A05	0	-	0,5
PTA05	2,4	-	0,5
VA05	0	Vapor	0,5
IA05	0	Imersão	0,5
PTVA05	2,4	Vapor	0,5
PTIA05	2,4	Imersão	0,5
A1	0	-	1,0
PTA1	2,4	-	1,0
VA1	0	Vapor	1,0
IA1	0	Imersão	1,0
PTVA1	2,4	Vapor	1,0
PTIA1	2,4	Imersão	1,0

FONTE: A autora (2020).

O pré-tratamento (PT) seguiu 10 min de imersão das raízes de yacon em 2,4% de ácido cítrico; O branqueamento a vapor seguiu uma exposição de 10 min das raízes ao vapor de água; O branqueamento por imersão seguiu a imersão das raízes em 3 min em água fervente e imersão imediata após, em água fria (com gelo), por 10 s.

Posteriormente, para escolha dos ácidos conservantes em destaque, foi realizado um segundo delineamento experimental, tipo fatorial 6x3, totalizando 18 ensaios (5 ácidos + amostra controle, analisados nos tempos inicial, 24 h e 48 h). Os ácidos utilizados foram o ácido lactobiônico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico e ácido ascórbico. A Figura 7 esquematiza de forma clara a sequência de ações tomadas.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA SEQUENCIA DE TRATAMENTOS REALIZADOS PARA OBTER A COMBINAÇÃO DE TRATAMENTOS IDEAL PARA O SUCO DE YACON



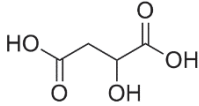
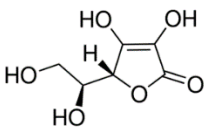
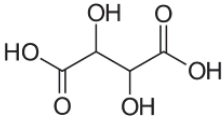
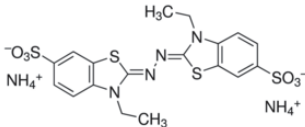
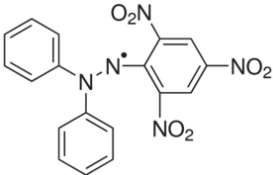
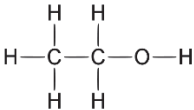
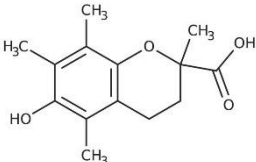
FONTE: A autora (2020).

3.2.2 Reagentes utilizados nesta etapa

Todos os reagents utilizados nesta etapa do estudo estão descritos no Quadro 2. Nomes, estruturas químicas (quando de interesse), marcas e grau de pureza foram especificados.

Quadro 2 – Reagentes utilizados para o estudo da combinação de tratamentos para conservação do suco de yacon.

Nome	Estrutura química	Número CAS	Grau de pureza	Marca
Ácido lactobiônico ou 4-O-β-D-Galactopiranosil-D-ácido glucônico	$C_{12}H_{22}O_{12}$ 	96-82-2	98%	Syngars Technology ©
Ácido cítrico ou ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico	$C_6H_8O_7$ 	77-92-9	99,85%	Neon© Comercial Ltda.

Nome	Estrutura química	Número CAS	Grau de pureza	Marca
DL - ácido málico ou DL - ácido hidroxibutadienóico	$C_4H_6O_5$ 	143435-96-5	99,82%	Neon© Comercial Ltda.
L - ácido ascórbico ou vitamina C	$C_6H_8O_6$ 	50-81-7	99,60%	Neon© Comercial Ltda.
L-(+)- ácido tartárico ou 2,3- ácido dihidroxisuccinico	$C_4H_6O_6$ 	87-69-4	98%	Neon© Comercial Ltda.
2,2-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfonico) Sal Diamonico ou ABTS	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ 	30931-67-0	98%	Sigma- Aldrich®
2,2-difenil-1- picrilhidrazila ou DPPH	$C_{18}H_{12}N_5O_6$ 	1898-66-4		Sigma- Aldrich®
Etanol ou álcool etílico	C_2H_6O 	64-17-5	99,5%	Biotec®
Trolox ou ácido 6- hidroxi-2,5,7,8- tetrametilo-3,4- dihidrocromeno-2- carboxílico	$C_{14}H_{18}O_4$ 	53188-07-1	>97%	Acros Organics® Thermo Fisher Scientific©
Persulfato de potássio	$K_2S_2O_8$	7727-21-1	>99%	Synth®
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	497-19-8	>99%	Vetec© Química Fina Ltda.

Nome	Estrutura química	Número CAS	Grau de pureza	Marca
Folin & Ciocalteu reagente fenol	$C_{10}H_5NaO_5S$	521-24-4	2N	Sigma-Aldrich®
Catecol ou pirocatecol	$C_6H_6O_2$	120-80-9	99%	Êxodo®
Ácido perclórico	$HClO_4$	7601-90-3	70%	Merck©
Ácido gálico ou 3,4,5-ácido trihidroxibenzóico	$C_7H_6O_5$	149-91-7	99.98%	Neon© Comercial Ltda.
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	7778-77-0	98.5%	Biotec®
Fosfato de potássio dibásico	K_2HPO_4	7758-11-4	99.93%	Neon© Comercial Ltda.
Água deionizada	-	-	-	Laboratech®

3.2.3 Análises

3.2.3.1 Atividade das PPOs

A atividade das PPOs do suco de yacon foi medida a 395 nm em espectrofotômetro (Nova Instruments®). Foi utilizado padrão catecol (10mM), adicionado de tampão fosfato de potássio 0,025M e amostra do suco de yacon (também em tampão fosfato 0,05M (pH 7.0), centrifugada 11.000g por 10 min). A reação foi realizada em banho-maria a 30 °C por 30 min e descontinuada com ácido perclórico 2N e posteriormente as amostras foram refrigeradas 8 °C. Em seguida, a atividade foi verificada pela alteração da absorvância, coletada periodicamente nos horários iniciais, 1, 4, 8, 12, 24, 28, 32 e 48 horas. Os resultados foram expressos por atividade enzimática, como alteração na densidade óptica por minuto, em que a diferença de 0,001 unidades de absorvância corresponde a 1 U.mL⁻¹. As leituras foram feitas nas amostras em triplicata para fins estatísticos (ANESE et al., 1994; LAGO; NOREÑA, 2014).

3.2.3.2 Cinética enzimática

A cinética de inativação enzimática foi avaliada por diferentes modelos, sendo eles os modelos de ordem zero (ZO) (Equação 2) e de primeira ordem (FO) (Equação 3), comumente aplicados aos alimentos.

$$C_t = C_i + k_0 t \quad \text{Eq. (2)}$$

$$C_t = C_i \exp(-k_1 t) \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde C_t and C_i são as concentrações no tempo (t) e inicial, respectivamente, k_0 e k_1 são as constantes cinéticas para os modelos de ordem zero e de primeira ordem, respectivamente, e t é o tempo de reação (em segundos), ou armazenamento.

O modelo de Weibull que também foi aplicado, serve para descrever a cinética de degradação microbiológica, enzimática e química, embora tenha sido desenvolvido inicialmente para descrever falhas de um sistema sujeito a estresse ao longo do tempo. A expressão matemática segue a Equação 4:

$$C_t = C_i \exp [-(k_\alpha t)^\beta] \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde k_α é a constante da taxa de reação, β é o fator relacionado ao formato, adimensional. A capacidade de previsão dos modelos mencionados foi avaliada por três erros distintos: erro absoluto médio (MAE), erro relativo médio (MRE) e raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE).

$$MAE = P^{-1} \sum_{i=1}^P (|\hat{y}_i - y_i|) \quad \text{Eq. (5)}$$

$$MRE = P^{-1} \sum_{i=1}^P \left(\frac{|\hat{y}_i - y_i|}{y_i} \right) \quad \text{Eq. (6)}$$

$$RMSE = \sqrt{P^{-1} \sum_{i=1}^P (\hat{y}_i - y_i)^2} \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde P é o número de pontos experimentais, y_i é o valor experimental e $\hat{y}_i$ é o valor calculado pelo modelo.

Para o modelo de mínimos quadrados parciais (PLS), além dos erros mencionados, foram considerados os erros de calibração, RMSEC e RMSECV. O algoritmo linear do PLS foi aplicado à correlação de dois conjuntos de dados (ZHENG; LU, 2011), tempo e atividade de PPO no Software Chemostat®. A atividade foi prevista pelos modelos para os diferentes tratamentos ácidos. A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) avaliou a proximidade dos resultados dos modelos, de acordo com a distância euclidiana e considerando os dados MAE, MRE, RMSE e R^2 .

3.2.3.3 Atividade Antioxidante Total (AAT)

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), baseado na captura do radical DPPH (60 μ M) por um antioxidante (Trolox), foi realizado por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O DPPH foi diluído em etanol 80% e este utilizado como branco. O radical ABTS (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) foi gerado na oxidação do ABTS (7mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) e banho-maria de 50 °C por 15 min, posteriormente reduzido na presença de um doador de prótons pelo antioxidante da amostra. A leitura foi realizada a 734 nm. Os resultados das leituras em foram expressos em μ M equivalente de Trolox.L⁻¹ (MILLER et al., 1993), considerando as modificações de (RUFINO et al., 2010). Ambas as metodologias foram executadas com incubação de 30 min no escuro e curva de calibração a partir do Trolox 2000 μ M.

3.2.3.4 Compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado por meio de reação com o reagente de Folin-Ciocalteu e leitura em 750 nm (YOON; LEE; CHOI, 2016). As leituras foram calculadas utilizando-se uma curva de calibração com o ácido gálico como referência (resultados expressos em μ M GAE.L⁻¹). As condições utilizadas para determinação do conteúdo fenólico foram: Carbonato de sódio (2%), reagente Folin-Ciocalteu (50%) 1:1 em água deionizada e reação em ambiente escuro em duas etapas, com carbonato 3 min e posterior a adição do Folin por 30 min.

3.2.3.5 Cor

A coloração dos sucos foi determinada por Colorímetro de bancada (HunterLab®) calibrado com os padrões branco e preto, iluminante D65. Os valores de L* (luminosidade; 0 preto; 100 branco), a* (+a, vermelho; -a, verde) e b* (+b, amarelo; -b, azul) da escala CIE L*a*b* proposto em 1976 pela *Comission Internationale de L'Eclairage*, foram determinados diretamente, em leitura nas amostras de suco acoplados em copo preto, acessório do equipamento. O cálculo da diferença total de cor ΔE foi feito pela Equação 8 (MCLAREN, 2008).

$$\Delta E = \sqrt[2]{(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)} \quad \text{Eq. (8)}$$

Onde:

ΔL = variação do L^* entre os dias de armazenamento;

Δa = variação do a^* entre os dias de armazenamento;

Δb = variação do b^* entre os dias de armazenamento.

O valor de C^* (croma) foi calculado de acordo com a Equação 9 (MCLAREN, 2008).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Eq. (9)}$$

3.2.3.6 pH e acidez titulável (AT)

O pH das amostras de suco foram medidos diretamente com potenciômetro com eletrodo de calomelano (Accumet®) calibrado com tampões 4 e 7. A acidez titulável das amostras, foram realizadas com reagente básico NaOH 0,10M e indicador fenolftaleína. Ambos seguiram a AOAC, (2005), métodos potenciométrico 925.10 e 942.15 respectivamente.

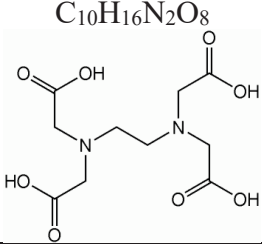
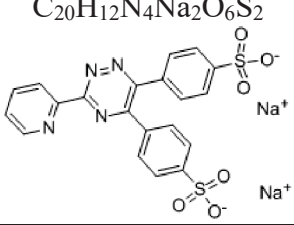
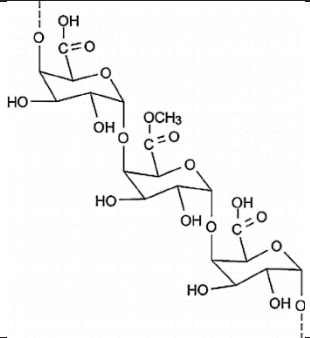
3.3 Comparação das propriedades do LBA com o ácido málico

Existem poucos estudos sobre o comportamento do ácido málico nos alimentos, nenhum focado em resultados quantitativos ou investigações sobre suas propriedades físico-químicas, úteis para a indústria alimentícia, ou mesmo na confirmação de suas propriedades quelantes de cálcio, texturizante e antioxidantes. Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar a maioria das propriedades físico-químicas do ácido málico, que se destacou na etapa anterior de conservação do suco de yacon, tanto sólido quanto em solução, que poderiam ser úteis para a indústria de alimentos entender seu potencial real. Tais propriedades foram comparadas com as encontradas para o LBA.

3.3.1 Reagentes utilizados nesta etapa

Além dos já mencionado no Quadro 2, outros foram utilizados e estão relacionados e descritos no Quadro 3.

Quadro 3 – Reagentes utilizados para o estudo das propriedades do ácido málico.

Nome	Estrutura química ou composição	Número CAS	Grau de pureza	Marca
Ágar Mueller-Hinton	Principais componentes: 30,0% infusão de carne 1,75% caseína hidrolisada 0,15% amido 1,7% ágar pH de 7,0 a 25 °C	-	-	Kasvi©
Caldo Mueller-Hinton	Só retira o ágar da composição acima mencionada. pH de 7,3 a 25 °C	-	-	Kasvi©
Clorafenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	56-75-7	-	Colgate®
Cloreto de cálcio	$CaCl_2$	10043-52-4	-	Alphatec®
EDTA ou ácido etilenodiamino tetra- acético	$C_{10}H_{16}N_2O_8$ 	60-00-4	0,01M	Biotec®
Ferrozina™ ou 3-(2- Piridil)-5,6-difenil- 1,2,4-triazina-p,p'- ácido disulfônico	$C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2$ 	63451-29-6	>97%	Sigma- Aldrich®
Pectina cítrica (HM) de alto teor de metoxilação		9000-69-5	>74% de ácido galacturô- nico	BioBrand©
Hidróxido de sódio	$NaOH$	1310-73-2	99%	Neon© Comercial Ltda.
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	7664-93-9	99,9%	Neon© Comercial Ltda.

3.3.2 Análises adicionais

Além das análises já descritas acima, de atividade antioxidante e pH, as análises abaixo também foram realizadas. O ácido málico sólido e diluído em água deionizada foi avaliado. Neste caso as soluções foram de 60%, 40%, 20%, 10% e 1% de ácido.

3.3.2.1 Comportamento com a água

A solubilidade do DL - ácido málico em água na faixa de temperatura de 10 °C a 55 °C foi determinada pelo método estático gravimétrico. Em frascos de 2 mL, foram adicionados água e excesso de ácido málico para saturar o sistema. A mistura foi agitada em vortex por 2 min e, posteriormente, os frascos foram colocados em banho termostático com circulação de água (Lab Compain©, RW-1025G, $\pm 0,5$ K), na temperatura desejada por 40 min, para atingir equilíbrio térmico. Após esse período, os frascos foram agitados por 2 min e recolocados no banho, onde foram mantidos por 4 horas. Com o auxílio de uma seringa, aproximadamente 1 mL da solução sobrenadante foi removido da mistura e adicionado ao béquer previamente identificado e pesado. Eles foram mantidos em uma estufa FANEM-515® a uma temperatura de 120 °C por 24 h.

Após 24 h na estufa, o béquer foi condicionado em dessecador por aproximadamente 2 h, até o sistema atingir a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A partir das medições do sobrenadante e da massa do soluto, a solubilidade foi determinada e expressa em porcentagem.

Sobre a higroscopicidade, para determinar as isotermas de sorção, a metodologia de Moraes, Rosa e Pinto, (2007) foi seguida com adaptações. As amostras de ácido málico tiveram seus valores de umidade equilibrados a 45 °C/48 h em estufa de circulação de ar. Aproximadamente 1,0 g de amostra foi pesado em um pequeno recipiente de papel alumínio e mantidos em recipientes de vidro hermético, com umidade relativa diferente resultante de soluções de H₂SO₄ ($d=1,84$ g/cm³) em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70% v/v). Os recipientes herméticos de vidro foram mantidos a temperaturas constantes (30 °C) por 20 dias. Essas amostras foram pesadas diariamente em balança analítica (precisão de 0,0001 g), apresentando massa constante ao final do período. A umidade em base seca foi calculada usando a Equação 10:

$$Xdb = \frac{\text{água remanescente}}{\text{massa seca}} \quad \text{Eq. (10)}$$

Em sequência, os dados experimentais foram ajustados usando o modelo de Halsey (HALSEY, 1985) por meio da equação 11:

$$Xdb = \left[\frac{-A}{\ln a_w} \right]^{\frac{1}{B}} \quad \text{Eq. (11)}$$

Onde A e B são constants do modelo, Xdb é a umidade (X) em base seca (db) e a_w é a atividade de água. Para a determinação da atividade da água, a amostra de DL - ácido málico anidro foi colocada em uma cápsula descartável do equipamento Aqualab 3TE® em uma quantidade suficiente para cobrir o fundo (aproximadamente 1,0 g). A atividade da água foi obtida por leitura direta no equipamento (precisão de $\pm 0,005$), à temperatura de 20 °C.

3.3.2.2 Estrutura química e perfil térmico

O ponto de fusão do DL-ácido málico foi determinado usando um sistema de ponto de fusão digital MP90 (Mettler-Toledo ©), versão de software 3.6.8/1.20. A temperatura inicial foi de 100 °C e a temperatura final de 140 °C, a uma taxa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹. O processo foi gravado em vídeo.

Para caracterizar o DL-ácido málico por difratometria de raios X (DRX), a amostra foi compactada em um suporte de vidro. As medidas foram realizadas com varredura de 3 a 50° de 2θ utilizando um Shimadzu® difratômetro (modelo XRD-6000) com fonte de radiação CuK_α de $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, tensão 40 kV, 30 mA de corrente, tempo de 2°.min⁻¹ e passo de 0,02 graus.

A morfologia e a composição química qualitativa foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um microscópio eletrônico Tescan® VEGA3LMU com o *software* AZ Tech. O DL-ácido málico foi depositado em uma fita dupla face de cobre e, após a análise por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), a amostra foi pulverizada com uma fina camada de ouro para a imagem do MEV.

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada no Netzsch® STA 449 F3 Jupiter. A amostra foi aquecida em um suporte de amostra de platina sob atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 50 mL.min⁻¹ e taxa de aquecimento de 5 °C.min⁻¹.

3.3.2.3 Capacidade quelante

A determinação da capacidade quelante do íon ferro, foi feita de acordo com as metodologias de Ak e Gülçin, (2008) e Gülçin, (2006). As amostras diluídas (2 mL) foram adicionadas de 0,2 mL de sulfato de amônio ferroso na concentração de 2 mmol e 0,4 mL de uma solução de ferrozina 5 mmol, completando o tubo para 10 mL com água deionizada. A

atividade quelante do Fe^{2+} foi determinada avaliando a formação de um complexo de Fe^{2+} com ferrozina calculada pela Equação 12.

$$\text{Capacidade quelante de } \text{Fe}^{2+} \% = \left[\left(\frac{\text{Abs}_{\text{Controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{Controle}}} \right) \right] * 100 \quad \text{Eq. (12)}$$

A leitura em espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de 562 nm, 40 min após adição dos reagentes, 30 min depois da adição de sulfato e 10 min depois da ferrozina. O branco consistiu de água, e como controle a amostra foi substituída por água, adicionada de sulfato e ferrozina (ausência da amostra) obtendo o volume final padronizado. Para traçar a curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0.1-0.0125 mg.mL⁻¹).

Para a determinação da capacidade quelante do íon cálcio, as amostras (1 mL) previamente diluídas em água foram adicionadas de 3 mL de NaOH (1M) e homogeneizadas. Sequencialmente foi adicionado 1 mL de CaCl_2 (50 mM) com agitação de 150 rpm/1 h/37 °C. Posteriormente, foi incorporado (20 µL) um indicador de cálcio (Murexida-2 gotas) e seguiu-se com a titulação com EDTA 0,01 M até a cor mudar de pink para roxo (o volume de EDTA gasto foi registrado, sendo este o V_1) (RATHORE et al., 1993).

Sequencialmente foi adicionado etanol absoluto até turvação seguido de centrifugação a 6.440g durante 60 min. O precipitado foi retirado e novamente dissolvido em água deionizada e adicionado dos mesmos volumes de CaCl_2 , NaOH e Murexida. A solução foi titulada com EDTA e o volume de EDTA gasto correspondeu ao volume de cálcio ligado (V_2). O cálculo da capacidade quelante dos íons cálcio foi calculado pela Equação 13.

$$\text{Atividade Quelante } \text{Ca}^{2+} \% = \left(\frac{V_2}{V_1} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (13)}$$

Onde V_1 corresponde ao volume gasto na titulação para estabelecer a quantidade total de cálcio. E V_2 corresponde ao volume gasto na titulação para determinar a quantidade de cálcio ligado.

3.3.2.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de disco difusão de acordo com a metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). As cepas de bactéria

utilizadas para as análises foram: *Clostridium perfringens* (ATCC® 13124™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Listeria monocytogenes* (ATCC® 7644™), *Salmonella sp.* (ATCC® 13076™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). As bactérias foram reativadas em caldo Mueller-Hinton (37 °C por 24 h) e plaqueadas em ágar Mueller-Hinton (37 °C por 24 h). Posteriormente foram transferidas para solução salina (0,85%) até atingir concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, equivalente à turvação da solução padrão de McFarland (bioMérieux©) de 0,5 (80 % de transmitância). As amostras diluídas (60%, 40%, 20%, 10% e 1%) foram incorporadas (20 µL) aos discos brancos estéreis (Laborclin©) e depositadas sobre o ágar Mueller-Hinton (25 mL) solidificado e inoculado previamente com os microrganismos correspondentes (10^8 UFC.mL⁻¹). Como controle positivo foram utilizados discos incorporados de clorafenicol 30 µg e como controle negativo foram utilizados água deionizada (solvente das amostras) e etanol. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 h. A determinação da inibição do crescimento microbiano foi feita por meio da medida dos halos inibitórios, em milímetros, com paquímetro digital.

3.3.2.5 Estabilidade de géis de pectina

Para acessar o efeito do ácido málico na textura do gel de pectina, supostamente adequado devido à sua capacidade tampão, mas sem dados quantitativos na literatura, foram comparados os géis de pectina com LBA, ácido cítrico e málico. A suspensão de pectina foi preparada adicionando 1% (m/v) de pectina cítrica e 1% de ácido cítrico/málico/lactobiônico em 100 mL de água deionizada, seguido de 3 h de agitação, até a dissolução completa. O método foi adaptado de Guo et al., (2014). Em seguida, o pH foi corrigido para 3,4 e 16 g de cloreto de cálcio foram gradualmente adicionados à solução, sem agitação adicional, apenas uma mistura suave. A reologia foi avaliada em um reômetro (Brookfield Ametek©), onde as propriedades viscoelásticas foram medidas pelo teste de varredura de frequência, em uma faixa de 0,01 a 10 Hz, durante 300 s, com probe tipo pá VT 80-40. A tensão de cisalhamento (Pa) foi medida em função da frequência (Hz) e expressa em escala logarítmica.

A sinére dos géis foi determinada de acordo com Demiate, Oetterer e Wosiacki, (2001), onde os géis de pectina foram separados em três amostras de 25 g e congelados a -18 °C em sacos plásticos herméticos. Os géis foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento, do congelador (72 h) ao descongelamento a 40 °C por 1 h. A quantidade de água liberada dos géis sob pressão reduzida (-490 mmHg) foi medida gravimetricamente e expressa como água liberada (%) relacionada à massa inicial.

3.4 Potencial prebiótico e estabilidade do suco de yacon

3.4.1 Reagentes utilizados nesta etapa

Além dos já mencionado nos Quadros 2 e 3, outros reagentes foram utilizados e estão relacionados e descritos no Quadro 4.

Quadro 4 – Reagentes utilizados para o estudo do potencial prebiótico do suco de yacon.

Nome	Estrutura química ou composição	Número CAS	Grau de pureza	Marca
Ágar MRS (Man, Rogosa and Sharpe)	1,0 % de peptona 1,0 % de extrato de carne bovina 0,4 % de extrato de levedura ~~2,0 % de glicose*~~ 0,5 % de acetato de sódio tri-hidratado 0,1 % de polissorbato 80 (também conhecido como Tween 80) 0,2 % de hidrogenofosfato de dipotássio 0,2 % de citrato de triamônio 0,02 % de sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,005 % de sulfato de manganês tetrahidratado 1,0 % de ágar pH ajustado para 6,2 a 25 ° C	-	-	Kasvi©
Caldo MRS	Só retira o ágar da composição acima mencionada. pH de 7,2 a 25 ° C	-	-	Merck©
FOS ou Fructooligosacarídeos da chicória	FOS + Inulina	-	>90%	Sigma-Aldrich®
D-(+)-Glicose	$C_6H_{12}O_6$	50-99-7	>99,5%	Sigma-Aldrich®
Ácido clorídrico	HCl	7647-01-0	37%	Biotec®
Sais biliares	Sal de sódio do ácido cólico, ~ 50% e sal de sódio do ácido desoxicólico, ~ 50%	-	-	Sigma-Aldrich®

*Glicose foi retirada da formulação pois várias fontes de carbono seriam testadas.

3.4.2 Análises adicionais

Além das análises que repetem as metodologias descritas acima, de antioxidantes, polifenóis totais, pH, acidez, cor e capacidade quelante, tem-se as listadas na sequência.

3.4.2.1 Microbiologia das amostras de suco de yacon

Como estabelecido pela RDC 12 (BRASIL, 2001) as análises obrigatórias que foram realizadas compreendem coliformes a 45 °C e *E. coli*, além de pesquisa de *Salmonella* sp., seguindo a metodologia descrita por Silva et al., (2007). Além disso, foi feita a contagem de fungos filamentosos e leveduras. Os resultados foram expressos como UFC/mL para *E. coli* e fungos, ausência/mL para os coliformes a 45 °C e ausência/25 mL para *Salmonella* spp.

3.4.2.2 Polifenóis extraíveis totais (PET)

Foram determinados por meio de reação com o reagente de Folin & Ciocalteu (1:3) e leitura em 765 nm, utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico como referência (resultados expressos em mg GAE.100 g⁻¹), conforme metodologia descrita por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto, (1997) e Obanda, Owuor e Taylor, (1997) .

3.4.2.3 Reativação de cepas e coloração gram

As cepas probióticas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* da Probiotical© S.p.A. (Via E. Mattei 3 28100, Novara, Italy) foram obtidas por doação da Coana⁵ - Solução em microrganismos e probióticos, que contam com fornecedores europeus líderes neste segmento, e que atendem as mais rigorosas normas internacionais e padrões de qualidade (ISO). Três metodologias sugeridas pela Coana foram testadas para reativar as cepas liofilizadas: Umidade prévia de 24h, inoculação direta em caldo MRS e banho + inoculação no caldo MRS. O método que alcançou primeiro a ativação, seguiu com adição direta de uma alçada de bactéria liofilizada em caldo MRS (5 mL), e incubação em jarra de anaerobiose, por 24 h/37 °C. As cepas reativadas foram congeladas em eppendorf (-18 °C).

⁵ COANA Importação e Exportação Ltda. Estrada João Januário da Silva, 7101 - Ratones , Florianópolis, SC. Tel. (48) 3266 8200 CEP: 88.052-200. CNPJ:05.946.890/0001-42. @Copyright 2017 - Coana | Todos os direitos reservados.

Para teste de pureza das cepas, a coloração gram foi performada nas três bactérias reativadas. Primeiramente preparou-se o esfregaço, foi adicionada uma gota de solução salina (0,85%) na lâmina e com a alça de platina flambada foi colocada uma alçada da colônia da bactéria em questão. Com auxílio da alça de platina foram feitos movimentos circulares para espalhar a colônia. A lâmina foi seca ao redor da chama por tempo suficiente para fixar o esfregaço. Depois foi adicionada a solução de cristal violeta deixando agir por 1 min. O corante foi então escoado e a lâmina lavada com água deionizada.

Em seguida foi feita a cobertura com lugol que também foi escoada após 1 min. Então, o solvente de descoloração foi adicionado (acetona:etanol/20:80) por 20 segundos e também escoado. A última etapa, foi a adição do solvente fucsina, que cobriu a lâmina por 30 segundos e escoado. A lâmina secou perto da chama. A observação foi feita em microscópio (Olympus®, Japan) focando primeiramente nas lentes de 10x e 40x, em seguida foi adicionado 1 gota do óleo de imersão sobre a lâmina, colocado lamínula e leitura em 100x. A classificação das bactérias foram em Gram positivas (roxas) e Gram negativas (vermelhas ou rosadas).

3.4.2.4 *Análise do potencial prebiótico in vitro*

Adaptado de Agte et al., (2010); Pedreschi et al., (2003) e Sousa et al., (2015b), o potencial prebiótico do suco fresco de yacon foi medido *in vitro*. Primeiramente o suco passou por uma digestão gastrointestinal *in vitro*, simulando o processo de digestão (LEONE et al., 2017) para então testar o potencial prebiótico. Uma aliquota de 1 mL do suco de yacon foi adicionado em 9 mL de HCl 0,08 M, NaCl 0,2% e pH ajustado para 1,5. O frasco com a mistura foi incubado a 37 °C por 2 h, agitação de 50 rpm, em banho Dubnoff (Nova Ética®) simulando até aqui a digestão estomacal. A resistência aos sais biliares foi realizada em segunda etapa onde foi adicionada a mistura sob agitação 9 mL do suco intestinal. Este foi preparado com KH₂PO₄ 0,05 M, contendo 0,6% de sais biliares, e pH ajustado para 7,4. A segunda incubação durou 150 min/37 °C.

As fontes de carbono que foram adicionadas ao MRS, foram na proporção de 20 g/L (2%), de glicose (como fonte padrão de carbono do MRS), FOS (como referência e controle para a fonte de yacon) e o resíduo digerido de suco de yacon. Então, separadamente o ágar foi vertido nas placas e inoculado com 100 µL da cultura bacteriana e incubado a 37°C/24 h. Foram plaqueadas inicialmente as diluições Log 7, 8, 9 e 10, e mais para o final do período de armazenamento foram utilizadas as diluições Log 5 e 6. Os tempos analisados foram os dias de armazenamento: Inicial, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180.

3.4.2.5 Indicação de bioconversão de açúcares por HPLC

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada em cromatógrafo Waters®, equipado com bomba quaternária e injetor automático, detector PDA 2998, em coluna Zorbax NH2 5 µm, C18 (250 x 4,6 mm), Agilent®. Os solventes usados foram acetonitrila (Fase A) e água Milli-Q (Fase B), sonicados e filtrados através de uma membrana de Teflon de 0,45 µm. Foi utilizado regime de eluição isocrática com 70% A e 30% B, por 20 min. Uma alíquota de 10 µL do suco diluído foi injetada após a filtração em um filtro de PTFE hidrofílico de 0,13 mm.

3.5 Análise estatística dos dados

Para os resultados das análises apresentadas até agora, o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) foi aplicado para verificar a normalidade dos resultados obtidos, além da homocedasticidade que foi testada pelo teste de Bartlett. As análises de variância aplicadas foram, Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e ANOVA ($p < 0,05$) para dados com normalidade confirmada. O teste de diferença de média com amostra controle, foi avaliado por Fisher LSD, e sem amostra controle, por Tukey. A comparação de duas amostras se deu pelos testes T (paramétrico) e U de Mann-Whitney (não paramétrico). MANOVA ($p < 0,05$) e Análise Canônica Discriminante foram aplicadas para determinar análises que diferenciaram os sucos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (sendo que todo o conjunto de dados contou com médias de triplicatas; $n=3$). Todos os testes, gráficos e modelagens matemáticas foram realizados pelos *softwares* Statistica® 12.5, Origin® 8.0 e ChemoStat® V2 (PLS). A análise HCA foi performada no *software* Past® 3.26.

3.6 Perfil sensorial de suco de yacon

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) CAEE número 28625020.3.0000.0102 e Parecer número 3.934.157. Ficou aprovado que o Perfil Flash e aceitabilidade seriam aplicados nas amostras de suco de yacon com ácido málico, ácido tartárico e sem acidulante. 50 pessoas participaram no total, devido aos tempos de Pandemia em 2020, todos os procedimentos foram realizados individualmente com hora marcada, em agosto de 2020. Todos os procedimentos de proteção contra a Covid-19 recomendados pela OMS foram seguidos sem restrição. Álcool 70% esteve disponível e a máscara era obrigatória.

3.6.1 Seleção de avaliadores para avaliação de odor e sabor

3.6.1.1 Preparo das amostras

O preparo das amostras para teste de odor (ISO 5496, 2006) teve como base o trabalho desenvolvido por Garcia-Torchelsen et al., (2009). Amostras referência de odor, pertencentes aos cinco grupos de odores foram separadas conforme descrito: Especiarias (cravo, canela, alecrim, orégano); Floral (perfume de rosas, sabão em pó, amaciante, lavanda); Frutado (essência de uva, banana, baunilha e laranja); Queimado (açúcar queimado, papel queimado, cinza de cigarro e café torrado) e Resinoso (vinagre, alvejante, eucalipto e cânfora). As amostras sólidas foram dissolvidas 1 g a cada 4 mL de água deionizada. As amostras líquidas foram diluídas, 1 mL para 9 mL de água deionizada. As amostras em pó e secas, foram dissolvidas ou suspensas, 1 g de amostra em 9 mL de água.

Alíquotas de 2 mL dessas diluições foram utilizadas para embeber os chumaços de algodão utilizados como suporte de absorção dos voláteis, colocados em 3 cm do fundo de tubos de ensaio de vidro. Os tubos de ensaio foram fechados com chumaço de algodão, cobertos com papel alumínio e codificados com três dígitos aleatórios. As amostras foram mantidas sob aquecimento a $50 \pm 2^\circ\text{C}$, para que os voláteis se mantenham difundidos e então foram oferecidos aos avaliadores.

Para a seleção de avaliadores aptos no teste de gostos básicos (ISO 3972, 2011), amostras padrão com os 5 gostos básicos foram fornecidas: salgado (cloreto de sódio em solução de 0,4%); doce (sacarose em solução de 1%); amargo (cafeína em solução de 0,035%); ácido (ácido cítrico em solução de 0,035%) e umami (monoglutamato de sódio em solução de 1%).

3.6.1.2 Aplicação do teste de seleção

A seleção para avaliação de odor foi performada segundo o prisma de classificação de Henning (NBR, 1993; QUEIROZ; TREPTOW, 2006). A seleção dos avaliadores contou com a estrutura do Laboratório de Análise Sensorial (LABTECAL) da UFPR, com alunos, técnicos e professores, principalmente do PPGEAL. Os avaliadores foram convidados a entrar na cabine sensorial previamente preparada, onde foi fornecida a série de tubos e copinhos com as amostras e uma ficha para descrever os estímulos percebidos.

3.6.1.3 Tratamento de dados da seleção

Durante a seleção, os cálculos foram feitos individualmente para cada avaliador de acordo com a ISO 5496 (2006). A descrição atribuída foi avaliada pelos pesquisadores do estudo onde respostas integralmente assertivas ganharam nota 5 (cinco), parcialmente assertivas recebendo nota 3 (três), e nenhuma descrição ou não correlacionadas ganharam nota 0 (zero). A nota 1 foi dada para aqueles que perceberem o estímulo, mas não o identificarem. Para gostos básicos, foi avaliada apenas a porcentagem de acertos, e considerados aptos os que obtiveram acima de 70%.

Os resultados de odor foram avaliados através do desvio padrão (dp) e aptidão. Em uma primeira etapa, as respostas dos avaliadores foram ordenadas pelo grau de dificuldade que obtiveram em cada categoria, convertendo em desvio padrão. Se o desvio final do avaliador resultou em um número superior a 1, este foi considerado apto. O resultado da seleção foi avaliado considerado também pela análise sequencial de Wald (ISO 16820, 2004). O avaliador que se mostrou apto em ambos os testes, participou do Perfil Flash descrito a seguir.

3.6.2 Perfil descritivo pelo método Perfil Flash

3.6.2.1 Preparo das amostras

As amostras de suco de yacon foram colocadas em copinhos descartáveis (30 mL) e estes foram cobertos com papel alumínio e codificados com três dígitos aleatórios. As amostras foram mantidas em temperatura de refrigeração. Os sucos avaliados, foram os sucos de yacon com ácido málico 1%, tartárico 1% e sem ácido (controle), destaques do Capítulo 4. O suco com LBA não pôde passar por avaliação sensorial.

3.6.2.2 Levantamento individual de terminologias

A avaliação das amostras para levantamento de termos foi realizada de acordo com o método de Grid (ISO 13299, 2016). As amostras foram apresentadas em pares aos avaliadores, aos quais foi solicitado que descrevessem as similaridades e diferenças entre elas, gerando para cada par uma lista de atributos sobre cor, odor, gosto e sabor. Posteriormente, cada avaliador recebeu uma ficha individual com os atributos levantados, que foram acordados em reunião individual após o levantamento de atributos.

3.6.2.3 Avaliação das amostras de suco

A segunda etapa da técnica Perfil Flash consistiu na avaliação das amostras. Cada avaliador recebeu as amostras em etapa única. As amostras foram codificadas com três dígitos aleatórios e foi pedido aos avaliadores que as ordenassem em cada atributo, por meio de escala não estruturada de 10 cm, ancorada apenas nos dois extremos pelos termos “fraco” e “forte” (ALBERT et al., 2011). O tempo total da análise variou de 10 a 20 min, evitando assim a fadiga sensorial (KALSCHNE et al., 2018; TERHAAG; BENASSI, 2011).

3.6.2.4 Análise estatística dos resultados do Perfil Flash

A *Generalised Procrustes Analysis* (GPA), Análise de Procrustes Generalizada foi empregada na análise dos resultados do perfil sensorial por meio do Perfil Flash através do software XLSTAT® 2018.1.49630 (Addinsoft™). A matriz dos dados corresponde a cada avaliador e o biplot do GPA mostrou a magnitude da diferença das amostras. Os parâmetros principais do GPA foram: Número de iterações (500) (Method: Commandeur, type of biplot: Correlation biplot/ Coefficient = Automatic).

3.6.2.5 Aceitabilidade e intenção de compra

O teste de aceitabilidade das amostras foi realizado por escala hedônica de 9 pontos (desgostei muitíssimo – gostei muitíssimo), onde os parâmetros avaliados foram a aparência, cor, odor, sabor, textura e aceitabilidade global. A intenção de compra foi avaliada em escala verbal de 3 pontos (1 – certamente compraria; 2 – talvez compraria e 3 – não compraria). O teste sensorial de intenção de compra foi avaliado apenas por porcentagem de cada resposta (DUTCOSKY, 2013).

Os dados provenientes da análise de perfil sensorial foram relacionados com as respostas do nariz eletrônico (*E-nose*), que foi realizado na UTFPR, Campus Campo Mourão, para os sucos adicionados de ácido málico, tartárico, LBA além do controle sem ácidos.

3.6.3 *E-nose* (Nariz eletrônico)

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, 10 mL de cada amostra foram utilizadas em frasco de 40 mL com tampa de rosca e septo de silicone. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Após serem colocadas nos frascos, as amostras foram mantidas

em dessecador (Nalgon, 0880) a 50 °C por 30 min (BONA, 2018) para a formação do *headspace* estático (HS). Foram avaliados o suco de yacon com ácido málico (M1 e M2), ácido tartárico (T1 e T2), ácido lactobiônico (L1 e L2) e controle (C1 e C2).

A análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) foi realizada, de acordo com o método de Vieira et al., (2020) com adaptações. Foi utilizado um nariz eletrônico feito em laboratório (MAKIMORI; BONA, 2019) equipado com seis metal-óxido-semicondutores (MOS) modelos de sensores de gás MQ3, MQ6, MQ9, MQ135, MQ136 e MQ137 (Hanwei Electronics). O seguinte conjunto de parâmetros foi usado durante a amostragem: temperatura da cápsula do sensor a 30 °C; tempo de purga inicial de 20 s; tempo de amostragem de 90 s (30 s para linha de base); tempo de purga final de 60 s; taxa de fluxo da bomba de 4 L/min. A aquisição de dados e o controle do equipamento foram realizados no software Enose CAD 2.3 (BONA, 2018).

3.6.3.1 Pré-processamento dos dados do E-nose

Os dados foram pré-tratados no software Enose CAD 2.3, fazendo a correção da linha de base pelo método de fração e suavização no algoritmo de Savitsky-Golay (polinômio de 1º grau e janela de 25 pontos). Posteriormente, os dados transitórios para cada sensor foram concatenados formando uma linha para cada amostra.

3.6.3.2 Análise sensométrica exploratória dos dados do E-nose

A análise exploratória dos dados do nariz eletrônico foi realizada por meio da análise de componentes principais (PCA) com dados centrados na média e análise de agrupamento hierárquico (HCA). Ambas as análises foram realizadas usando o aplicativo GAMMA (GALVAN et al., 2020) desenvolvido no MATLAB R2008b.

PARTE II

Resultados e discussão

Nesta segunda parte serão apresentados os resultados e discussões, divididos em 4 Capítulos.

CAPÍTULO 4 – Avaliação da cinética das PPOs em suco de yacon com LBA⁶

4.1 Composição química e características das raízes

O teor médio de umidade das raízes de yacon utilizadas foi de $90,67\% \pm 0,30$, e a composição restante encontrada foi de $1,26\% \pm 0,22$ de conteúdo lipídico, $0,35\% \pm 0,09$ de proteína, $0,64\% \pm 0,06$ de cinzas e, portanto, o teor médio de carboidratos foi $7,08\%$. Os parâmetros de cor das raízes encontrados antes do processamento foram (em média das raízes utilizadas) $L^* 38,41 \pm 1,12$, $a^* 14,18 \pm 0,96$ e $b^* 20,76 \pm 1,58$. Além disso, o valor calórico final médio das raízes de yacon utilizadas foi de $41,06 \text{ kcal.}100\text{g}^{-1}$. A baixa quantidade de calorias estabelecida na matéria-prima, com base em uma dieta de $2000 \text{ kcal.dia}^{-1}$, reforça seu potencial uso em dietas equilibradas e até restritivas. Complementando as informações, o pH médio foi de $6,25 \pm 0,09$ e a quantidade média de sólidos solúveis foi de $9,68 \pm 1,36$ °Brix.

Os resultados são corroborados pela literatura que menciona pH em torno de 6,5, sólidos solúveis de 8,58 - 13,60 °Brix, cinzas de 0,16-0,55% e umidade em torno de 90% (88-91%) para raízes de yacon (SILVA et al., 2018). Saldaña et al. (2014) relataram valores de 10 a 20 em relação aos parâmetros de cor a^* (tendência ao vermelho); Silva et al. (2018) mostraram valores L^* próximos a 40 e o parâmetro b^* foi o que mais variou na literatura. Este fato é justificado pela variação da cor amarela predominante nas raízes de yacon cultivadas em território brasileiro, que vai de leve a intensa (QUINTEROS, 2000; SILVA et al., 2018). Os valores b^* do presente estudo estão mais próximos do resultado encontrado para fatias de yacon comerciais ($18,10 \pm 1,40$) investigadas por Del Castillo et al. (2016).

4.2 Combinação de tratamentos para suco de yacon

Os resultados apresentados na Tabela 2 destacaram algumas respostas. Os tratamentos com branqueamento a vapor e LBA adicionados de 0,5 e 1% (VA05/VA1) apresentaram maiores valores de DPPH, ABTS e fenólicos totais. Os três fatores (pré-tratamento, branqueamento e adição de LBA) foram significativos ($p < 0,05$) e, portanto, uma análise multivariada foi realizada para determinar os tratamentos destacados (Apêndice A).

⁶ Deste Capítulo 4, surgiu o artigo publicado na Revista **Innovative Food Science and Emerging Technologies**: MARQUES, C. et al. *Lactobionic acid as a suitable food preservative for yacon juice*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 64, p. 102400, ago. 2020.

Tabela 2 - Resultados da capacidade antioxidante e do conteúdo fenólico do suco de yacon em diferentes tratamentos

Amostra	DPPH ($\mu\text{M Trolox.L}^{-1}$)			ABTS ($\mu\text{M Trolox.L}^{-1}$)			Fenólicos totais ($\mu\text{M GAE.L}^{-1}$)		
	Inicial	24 horas	48 horas	Inicial	24 horas	48 horas	Inicial	24 horas	48 horas
Controle	1691,39 ^{aB} ± 66,78	1410,00 ^{bC} ± 0,01	924,44 ^{cC} ± 3,93	1600,00 ^a ± 4,28	1369,70 ^b ± 10,71	1163,64 ^c ± 5,89	1448,00 ^a ± 28,28	1223,00 ^b ± 7,07	1088,00 ^c ± 0,00
PT	1802,22 ^a ± 19,64	1277,22 ^{bBC} ± 31,43	941,11 ^{cBC} ± 11,79	1280,30 ^a ± 16,07	1382,58 ^{bB} ± 53,56	825,76 ^{cC} ± 5,36	1398,00 ^a ± 70,71	1389,00 ^a ± 21,21	1059,00 ^b ± 21,21
V	2237,78 ^a ± 39,28	2148,89 ^{ab} ± 7,86	2046,67 ^b ± 11,79	2654,54 ^a ± 12,86	1703,03 ^b ± 26,78	1628,78 ^c ± 5,36	2168,00 ± 48,83	2028,00 ± 0,00	1958,00 ± 0,00
I	2077,22 ^a ± 7,86	2032,78 ^a ± 23,57	1768,89 ^b ± 43,21	1175,76 ^{aB} ± 4,28	1139,39 ^{bC} ± 4,39	1056,82 ^c ± 10,71	1509,00 ^a ± 106,06	1239,00 ^b ± 63,64	789,00 ^{cC} ± 106,06
PTV	2235,56 ± 11,79	2030,00 ± 43,21	2007,78 ± 35,36	2053,03 ± 5,35	1969,70 ± 31,60	1094,69 ± 0,00	1569,00 ± 106,06	1554,00 ± 0,00	984,00 ^B ± 42,43
PTI	2143,33 ^a ± 47,14	2076,67 ^a ± 47,14	1719,17 ^b ± 19,64	2128,78 ^a ± 21,42	1912,88 ^b ± 0,00	1545,45 ^c ± 10,71	1683,00 ^a ± 63,64	1528,00 ^a ± 14,14	1418,00 ^b ± 42,43
A05	1720,40 ^a ± 37,31	1490,63 ^b ± 47,86	1396,45 ^c ± 6,65	1275,18 ^{aB} ± 56,12	1232,72 ^a ± 115,04	923,58 ^{bC} ± 55,36	1328,33 ^{cC} ± 53,89	1093,33 ^{bC} ± 92,81	1018,00 ^b ± 29,59
PTA05	1802,22 ^a ± 11,78	1466,11 ^b ± 39,28	1410,56 ^c ± 7,86	1700,76 ^a ± 0,00	1227,27 ^b ± 32,14	1160,61 ^{cB} ± 8,57	1374,00 ^{aB} ± 127,27	1313,00 ^{ab} ± 77,78	1188,00 ^b ± 14,14
VA05	2595,42 ^{aA} ± 0,00	2562,08 ^{aA} ± 17,68	2541,25 ^{baA} ± 23,57	3257,58 ^{aA} ± 5,35	2488,64 ^{baB} ± 10,71	2053,03 ^{cA} ± 5,35	3275,33 ^{aAB} ± 51,85	2992,00 ^{baA} ± 113,13	2908,67 ^{cA} ± 32,99
IA05	2030,00 ^a ± 27,50	1960,56 ^b ± 47,14	1274,44 ^c ± 3,93	2219,70 ^a ± 26,78	1859,84 ^b ± 53,57	1810,60 ^b ± 5,36	1493,00 ^a ± 21,21	1213,00 ^{bC} ± 35,35	1179,00 ^b ± 21,21
PTVA05	2166,11 ^a ± 23,57	1801,11 ^b ± 9,82	1665,56 ^c ± 31,43	2143,94 ^a ± 85,71	1522,73 ^b ± 5,36	1443,18 ^b ± 10,71	1818,00 ^a ± 42,42	1608,00 ^b ± 14,14	1603,00 ^b ± 49,50
PTIA05	2078,75 ^a ± 23,57	1717,78 ^b ± 9,82	1690,00 ^b ± 37,32	1916,67 ^a ± 16,07	1745,45 ^b ± 21,43	1280,30 ^c ± 42,85	1723,00 ± 7,07	1713,00 ± 35,35	1698,00 ± 14,12
A1	1801,94 ^a ± 3,44	1622,19 ^b ± 49,32	1466,60 ^c ± 74,21	1884,34 ^a ± 25,96	1652,52 ^b ± 81,21	1557,30 ^b ± 57,13	1673,67 ± 63,80	1571,67 ± 48,23	1439,33 ± 192,63
PTA1	1812,08 ^a ± 5,89	1648,89 ^b ± 23,57	1504,44 ^c ± 55,00	1958,33 ^a ± 32,14	1666,67 ^b ± 58,92	1632,57 ^b ± 10,71	1702,00 ^a ± 70,71	1614,00 ^{ab} ± 84,85	1533,00 ^b ± 49,50
VA1	3055,00 ^{aA} ± 15,71	2813,33 ^{baA} ± 3,93	2691,25 ^{baA} ± 17,68	3181,81 ^{aaA} ± 10,71	2886,36 ^{baA} ± 5,36	2799,24 ^{baA} ± 10,71	3318,67 ^{aA} ± 9,43	2952,00 ^{baB} ± 56,60	2798,67 ^{baA} ± 9,43
IA1	2287,08 ^a ± 88,39	2241,25 ^a ± 23,57	1638,61 ^b ± 11,79	2231,06 ^a ± 10,71	2174,24 ^b ± 21,43	1921,22 ^c ± 12,86	1988,67 ^a ± 14,14	1933,00 ^a ± 77,78	1433,00 ^b ± 77,78
PTVA1	2528,75 ^a ± 70,71	2435,00 ^a ± 85,44	1792,78 ^b ± 5,89	2333,33 ^a ± 26,78	1689,39 ^b ± 42,85	1295,45 ^c ± 21,42	2775,33 ± 98,99	2722,00 ^{AB} ± 89,56	2712,00 ^A ± 84,85
PTIA1	2162,08 ^a ± 29,46	1964,17 ^b ± 2,95	1492,78 ^c ± 13,75	2087,12 ^a ± 0,00	2060,61 ^a ± 26,78	1878,78 ^b ± 4,28	2352,00 ^a ± 56,57	2345,33 ^{ab} ± 84,85	2238,67 ^b ± 15,85

Teste de Kruskal-Wallis realizado entre os tratamentos e ANOVA e teste de Tukey entre os dias p < 0,05; n = 3. Letras maiúsculas diferentes em uma coluna demonstram diferença significativa entre os tratamentos em um mesmo dia de análise. Letras diferentes em uma linha denotam diferença significativa entre os dias. PT = pré-tratamento; V = vapor; I = imersão; A05 = ácido lactobiónico a 0,5% e A1 = ácido lactobiónico a 1%. FONTE: A autora (2019).

4.2.1 Efeitos do pré-tratamento e branqueamento

Com 80,21% de explicação em dois fatores, a PCA indicou que os tratamentos VA05 e VA1 apresentaram maiores atividades antioxidantes, pois foram capazes de manter os compostos fenólicos mais efetivamente.

Sem nenhum tratamento, a amostra Controle, quando comparada às demais (Tabela 2), mostrou que sem PT e apenas com o branqueamento a vapor das raízes de yacon (amostra V), é possível manter parte das propriedades do suco em 48 h. O suco de yacon (Controle) escurece rapidamente após o processamento, passando de tons de amarelo, como as amostras tratadas com ácido, para verde escuro (Fig 9) e, portanto, permanece no armazenamento refrigerado sem diferença de cor visível ($\Delta E < 2,0$; (MOKRZYCKI; TATOL, 2011)) aos olhos não treinados, durante 48 h, assim como a amostra V (Tabela 4). Granato et al. (2011) e Quinteros (2000) observaram o mesmo comportamento de escurecimento do suco de yacon.

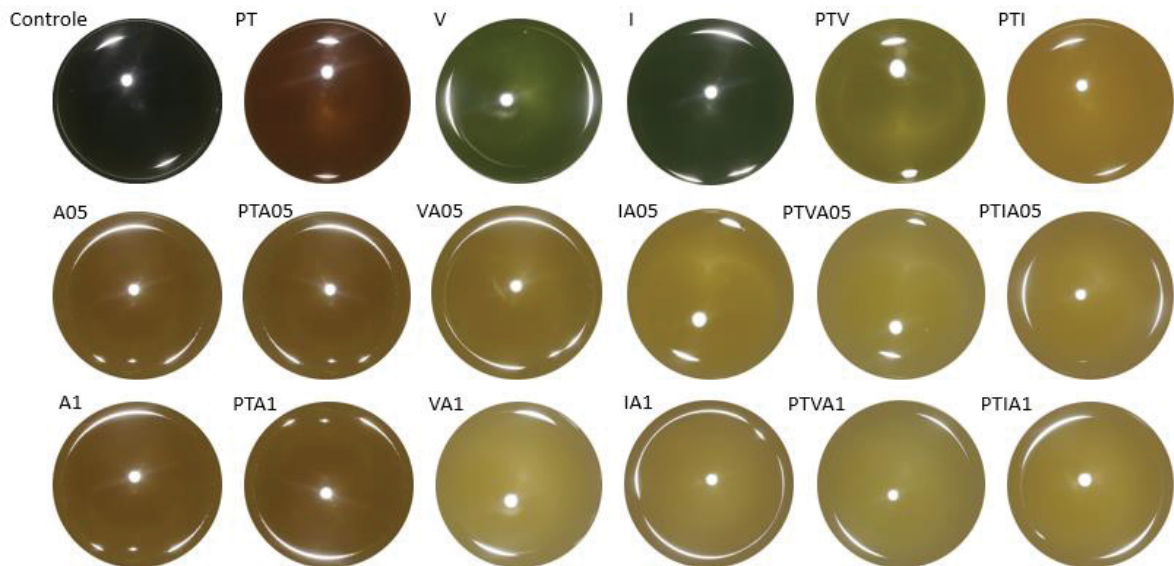
Dos tratamentos com branqueamento + ácido (VA05 a PTIA05 e VA1 a PTIA1), apareceram valores significativamente mais altos para os parâmetros L^* e b^* , demonstrando a eficiência dos tratamentos combinados na manutenção da cor amarelada da raiz, sem escurecimento significativo do suco em 48 h (Tabela 3 e Fig. 8). O branqueamento a vapor + LBA 1% (VA1) também não mostrou diferença de cor visível em 48 horas, ao contrário do LBA 0,5% (VA05), que exibiu uma diferença nas primeiras 24 horas ($\Delta E > 2,0$) (Tabela 4).

De acordo com Scher et al. (2015), o branqueamento por imersão lixivia importantes compostos da raiz de yacon, como inulina, frutose e glicose, entre outros, sendo recomendado o branqueamento a vapor. Os tratamentos IA05, PTIA05, IA1 e PTIA1, envolvendo imersão, apresentaram valores inferiores para DPPH, ABTS e fenólicos totais, com diferença significativa para ABTS e fenólicos (Kruskal-Wallis $p < 0,05$) quando comparados as amostras VA05, PTVA05, VA1 e PTVA1, que empregaram vapor. Isso mostra que o branqueamento por imersão lixivia compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante, e a imersão no pré-tratamento (PT) teve o mesmo efeito.

Os valores do ABTS revelaram que essa análise foi mais eficiente que o radical DPPH na detecção do potencial antioxidante das amostras (Tabela 2). No tempo inicial, o suco VA05 apresentou 53% mais atividade antioxidante (DPPH) em relação ao controle e 15% se comparado com a amostra submetida apenas ao branqueamento a vapor (V), enquanto no radical ABTS os valores aumentaram para 103% e 22%, respectivamente. A amostra do VA1 mostrou inicialmente 80% a mais de atividade antioxidante (DPPH) em comparação ao controle e 36% a mais que os valores da amostra V. Para o ABTS, aumentaram 98% e 19%,

respectivamente. Estes são valores significativos e reforçam a importância de combinar tratamentos para manter os compostos bioativos do suco de yacon, e também apontam como o processamento das raízes de yacon afeta seu conteúdo de compostos bioativos.

FIGURA 8 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA COR DO SUCO DE YACON APÓS 48 H DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.



PT = pré-tratamento; V = vapor; I = imersão; A05 = ácido lactobiônico a 0,5% e A1 = ácido lactobiônico a 1%.

FONTE: A autora (2019).

Tabela 3 – Resultados do pH e cor do suco de yacon em diferentes tratamentos

pH		L*			a*		b*					
Amostra	Inicial	24 horas	48 horas	Inicial	24 horas	48 horas	Inicial	24 horas	48 horas			
Controle	5,95 ^{AB} ± 0,05	5,98 ^{AB} ± 0,02	6,02 ^{AB} ± 0,02	1,51 ^{AB} ± 0,13	1,04 ^{abB} ± 0,35	0,37 ^{BB} ± 0,28	-0,44 ^{bAB} ± 0,12	-0,16 ^{BA} ± 0,11	0,25 ^{aAB} ± 0,12	0,21 ^{aAB} ± 0,11	-0,32 ^{BC} ± 0,21	
	5,42 ^{AB} ± 0,02	5,51 ^{BAB} ± 0,01	5,66 ^{AB} ± 0,02	0,36 ^C ± 0,16	0,66 ^C ± 0,06	0,45 ^B ± 0,25	1,05 ^{AB} ± 0,58	1,04 ^A ± 0,59	0,53 ^A ± 0,14	-0,14 ^B ± 0,67	-0,25 ^B ± 0,34	
V	6,05 ^A ± 0,05	6,05 ^A ± 0,05	6,12 ^A ± 0,02	1,67 ^{aAB} ± 0,42	1,28 ^{abBC} ± 0,11	0,60 ^{BB} ± 0,34	-0,62 ^{AB} ± 0,34	-0,76 ^A ± 0,87	-0,64 ^{AB} ± 0,06	0,43 ^B ± 1,05	0,25 ^{AB} ± 0,61	0,22 ^{AB} ± 0,20
I	5,98 ^{BAB} ± 0,01	6,03 ^{BA} ± 0,03	6,07 ^{BAB} ± 0,01	3,36 ^{aAB} ± 0,17	1,67 ^{BAB} ± 0,06	0,91 ^{CB} ± 0,07	-0,73 ^{AB} ± 0,05	-0,85 ^A ± 0,06	-0,49 ^{AB} ± 0,29	1,68 ^{aAB} ± 0,13	0,29 ^{bAB} ± 0,41	0,07 ^{bAB} ± 0,08
PTV	5,86 ^{BAB} ± 0,01	5,97 ^{aAB} ± 0,01	5,99 ^{aAB} ± 0,01	4,43 ^{aAB} ± 0,35	2,83 ^{BAB} ± 0,27	2,71 ^{BAB} ± 0,08	-0,80 ^{AB} ± 0,81	-0,83 ^A ± 0,25	-1,05 ^{AB} ± 0,17	2,11 ^{AB} ± 0,62	1,95 ^{AB} ± 0,35	2,13 ^{AB} ± 0,52
PTI	5,99 ^A ± 0,01	6,10 ^A ± 0,10	6,11 ^A ± 0,01	3,73 ^{cab} ± 0,13	7,55 ^{aAB} ± 0,19	5,75 ^{BAB} ± 0,13	0,23 ^{AB} ± 0,28	-0,12 ^A ± 0,48	0,13 ^{AB} ± 0,22	1,53 ^{cab} ± 0,29	5,48 ^{aAB} ± 0,22	3,95 ^{bAB} ± 0,13
A05	3,78 ^{AB} ± 0,01	3,88 ^{AB} ± 0,04	3,87 ^{AB} ± 0,06	4,52 ^{aAB} ± 0,38	2,31 ^{BAB} ± 0,43	2,45 ^{BAB} ± 0,29	0,51 ^{BAB} ± 0,91	0,70 ^A ± 0,78	-1,32 ^B ± 0,23	1,84 ^{AB} ± 0,89	2,20 ^{AB} ± 0,14	2,14 ^{AB} ± 0,21
PTA05	3,82 ^{BAB} ± 0,02	3,88 ^{abAB} ± 0,04	3,92 ^{aAB} ± 0,02	3,29 ^{AB} ± 0,51	3,58 ^{AB} ± 0,44	2,74 ^{AB} ± 0,29	1,21 ^{BA} ± 0,16	0,83 ^{abA} ± 0,11	0,39 ^{bAB} ± 0,35	3,23 ^{AB} ± 0,33	3,85 ^{AB} ± 0,47	3,53 ^{AB} ± 0,32
VA05	4,08 ^{BAB} ± 0,05	4,15 ^{abAB} ± 0,05	4,24 ^{aAB} ± 0,04	4,64 ^{cab} ± 0,25	7,94 ^{aAB} ± 0,22	6,70 ^{BAB} ± 0,15	-0,29 ^{aAB} ± 0,28	-0,79 ^{BA} ± 0,13	-0,76 ^{bAB} ± 0,07	2,75 ^{bAB} ± 0,56	6,49 ^{aAB} ± 0,55	5,65 ^{aAB} ± 0,43
IA05	4,10 ^{BAB} ± 0,10	4,16 ^{abAB} ± 0,02	4,28 ^{aAB} ± 0,01	12,86 ^{BA} ± 0,42	9,29 ^{BAB} ± 0,11	7,14 ^{cab} ± 0,17	-0,97 ^{AB} ± 0,17	-1,06 ^A ± 0,43	-0,74 ^{AB} ± 0,15	7,58 ^{BA} ± 0,14	6,01 ^{bAB} ± 0,12	4,42 ^{cab} ± 0,11
PTVA05	3,74 ^{BAB} ± 0,04	3,82 ^{aAB} ± 0,02	3,82 ^{aAB} ± 0,02	8,69 ^{AB} ± 0,03	9,12 ^{AB} ± 0,51	8,70 ^{AB} ± 0,16	-0,73 ^{AB} ± 0,11	-1,21 ^A ± 0,34	-1,32 ^B ± 0,28	3,51 ^{AB} ± 0,34	4,14 ^{AB} ± 0,51	3,97 ^{AB} ± 0,28
PTIA05	4,26 ^{cab} ± 0,03	4,33 ^{BAB} ± 0,03	4,41 ^{aAB} ± 0,01	6,02 ^{cab} ± 0,25	8,41 ^{BAB} ± 0,07	11,05 ^{aAB} ± 0,39	0,12 ^{aAB} ± 0,26	-0,55 ^{BA} ± 0,11	-0,37 ^{bAB} ± 0,26	2,07 ^{cab} ± 0,31	4,50 ^{bAB} ± 0,39	7,23 ^{aA} ± 0,16
A1	3,39 ^{BC} ± 0,04	3,45 ^{abAB} ± 0,01	3,48 ^{aAB} ± 0,02	4,63 ^{cab} ± 0,32	6,80 ^{aAB} ± 0,23	6,12 ^{BAB} ± 0,21	-0,20 ^{AB} ± 0,30	-0,38 ^A ± 0,37	-0,85 ^{AB} ± 0,05	2,99 ^{AB} ± 0,57	5,28 ^{AB} ± 2,03	5,80 ^{AB} ± 0,27
PTA1	3,40 ^{AB} ± 0,10	3,45 ^{AB} ± 0,01	3,50 ^{AB} ± 0,10	4,54 ^{abAB} ± 0,27	5,01 ^{aAB} ± 0,30	4,24 ^{BAB} ± 0,08	0,85 ^{aAB} ± 0,05	0,56 ^{aA} ± 0,27	-0,22 ^{bAB} ± 0,13	4,02 ^{bAB} ± 0,25	4,75 ^{abAB} ± 0,37	4,90 ^{aAB} ± 0,25
VA1	3,66 ^{AB} ± 0,03	3,66 ^{AB} ± 0,03	3,69 ^{AB} ± 0,01	10,10 ^{BAB} ± 0,41	10,16 ^{BAB} ± 0,18	11,77 ^{BA} ± 0,05	0,07 ^{aAB} ± 0,39	-0,73 ^{BA} ± 0,31	-0,49 ^{abAB} ± 0,08	6,08 ^{BAB} ± 0,49	7,45 ^{BA} ± 0,48	7,58 ^{BA} ± 0,10
IA1	3,56 ^{BAB} ± 0,15	3,59 ^{abAB} ± 0,03	3,63 ^{aAB} ± 0,01	8,21 ^{cab} ± 0,13	12,03 ^{aAB} ± 0,26	9,94 ^{BAB} ± 0,21	-0,22 ^{aAB} ± 0,11	-0,60 ^{BA} ± 0,10	-0,67 ^{bAB} ± 0,16	3,25 ^{bAB} ± 0,15	4,88 ^{aAB} ± 0,06	3,86 ^{bAB} ± 0,48
PTVA1	3,23 ^{BC} ± 0,04	3,26 ^{abB} ± 0,02	3,32 ^{BB} ± 0,03	9,52 ^{aAB} ± 0,13	10,03 ^{aAB} ± 0,21	7,49 ^{BAB} ± 0,33	-1,26 ^B ± 0,40	-1,19 ^A ± 0,32	-0,79 ^{AB} ± 0,08	3,55 ^{bAB} ± 0,47	4,33 ^{aAB} ± 0,20	2,32 ^{cab} ± 0,15
PTIA1	3,81 ^{BAB} ± 0,01	3,83 ^{abAB} ± 0,03	3,87 ^{aAB} ± 0,01	11,91 ^{abAB} ± 0,45	14,08 ^{aA} ± 3,08	8,70 ^{BAB} ± 0,20	-0,23 ^{aAB} ± 0,35	-0,19 ^A ± 0,26	-0,26 ^{AB} ± 0,17	6,61 ^{aA} ± 0,48	6,91 ^{aAB} ± 0,13	4,54 ^{bAB} ± 0,47

Teste de Kruskal-Wallis realizado entre os tratamentos e ANOVA e teste de Tukey entre os dias p < 0,05; n = 3. Letras maiúsculas diferentes em uma coluna demonstram diferença significativa entre os tratamentos em um mesmo dia de análise. Letras diferentes em uma linha denotam diferença significativa entre os dias. PT = pré-tratamento; V = vapor; I = imersão; A05 = ácido lactobiónico a 0,5% e A1 = ácido lactobiónico a 1%. FONTE: A autora (2019).

Tabela 4 – Resultados dos parâmetros de cor e ΔE do suco de yacon em diferentes tratamentos

Amostra	C*			ΔE
	Inicial	24 horas	48 horas	
Controle				
PT	0,691 ^B ± 0,167	0,263 ^B ± 0,152	0,411 ^B ± 0,235	0,631
V	1,752 ^{AB} ± 0,718	1,223 ^B ± 0,456	0,651 ^B ± 0,145	1,291
I	1,170 ^B ± 0,155	1,083 ^B ± 0,579	0,701 ^B ± 0,043	0,452
PTV	1,831 ^{AB} ± 0,116	0,955 ^B ± 0,113	0,498 ^B ± 0,292	2,189
PTI	2,320 ^{AB} ± 0,779	2,121 ^{AB} ± 0,422	2,380 ^{AB} ± 0,528	1,601
A05	1,570 ^{AB} ± 0,261	5,495 ^{AB} ± 0,222	3,953 ^{AB} ± 0,126	5,503
PTA05	1,976 ^{AB} ± 1,115	2,391 ^{AB} ± 0,276	2,526 ^{AB} ± 0,179	2,251
VA05	3,451 ^{AB} ± 0,364	3,945 ^{AB} ± 0,435	3,565 ^{AB} ± 0,344	0,788
IA05	2,772 ^{AB} ± 0,573	6,538 ^{AB} ± 0,557	5,705 ^{AB} ± 0,416	5,010
PTVA05	7,643 ^A ± 0,158	6,116 ^{AB} ± 0,105	4,487 ^{AB} ± 0,114	3,906
PTIA05	3,582 ^{AB} ± 0,353	4,315 ^{AB} ± 0,584	4,190 ^{AB} ± 0,286	0,902
A1	2,085 ^{AB} ± 0,301	4,538 ^{AB} ± 0,389	7,239 ^A ± 0,172	3,472
PTA1	3,002 ^{AB} ± 0,576	5,303 ^{AB} ± 2,044	5,862 ^{AB} ± 0,264	3,165
VA1	4,106 ^{AB} ± 0,237	4,792 ^{AB} ± 0,344	4,903 ^{AB} ± 0,247	0,916
IA1	6,090 ^{AB} ± 0,479	7,487 ^A ± 0,475	7,593 ^A ± 0,100	1,586
PTVA1	3,258 ^{AB} ± 0,146	4,921 ^{AB} ± 0,068	3,914 ^{AB} ± 0,500	4,175
PTIA1	3,769 ^{AB} ± 0,577	4,497 ^{AB} ± 0,275	2,452 ^{AB} ± 0,124	0,937
PTIA1	6,623 ^{AB} ± 0,490	6,916 ^A ± 0,142	4,552 ^{AB} ± 0,481	2,187

O teste de Kruskal-Wallis foi feito ($p < 0,05$); $n = 3$. Letras maiúsculas diferentes em uma coluna demonstram diferença significativa entre os tratamentos em um mesmo dia de análise. PT = pré-tratamento; V = vapor; I = imersão; A05 = ácido lactobiónico a 0,5% e A1 = ácido lactobiónico a 1%. FONTE: A autora (2019).

4.2.2 *Influência do LBA na atividade antioxidante e fenólicos totais*

Em termos de porcentagem de inibição de radicais, a amostra VA1 após 48 h ainda inibiu 83% do radical DPPH ($2691,25 \pm 17,68 \mu\text{M Trolox.L}^{-1}$) e 58% do radical ABTS ($2799,24 \pm 10,71 \mu\text{M Trolox.L}^{-1}$). A comparação com a amostra V é importante porque mostra a contribuição do LBA para o resultado e, de acordo com um estudo recente de Cardoso, Marques, Sotiles, et al. (2019), o LBA na concentração de 1%, como esteve no suco, contribui com apenas 4% de inibição do radical DPPH e 1% do ABTS. A amostra V inibiu 52,87% do radical DPPH e 34,52% do radical ABTS. Este fato sugere que a diferença nos valores de inibição foi causada pelo potencial do LBA em preservar o suco e, adicionalmente, por uma possível sinergia com os compostos da matriz alimentar em questão, o que pode ser atribuído às suas atividades antioxidantes e quelantes conhecidas (CARDOSO et al., 2019b).

O conteúdo de compostos fenólicos totais diminuiu 33% em 48 h (Controle), e o branqueamento a vapor (amostra V) reduziu este valor para 10%, com valores em torno de $2000 \mu\text{M GAE.L}^{-1}$. Já na amostra VA05, diminuiu 12% e na VA1 18%, com uma diferença significativa nessa diminuição, mas com valores mais altos, em torno de $3000 \mu\text{M GAE.L}^{-1}$. Este fato destaca a importância do branqueamento a vapor nas raízes antes da produção do suco, mantendo os compostos fenólicos e a relevância da adição de ácido pelo mesmo motivo, preservando as estruturas fenólicas da oxidação.

Lago e Noreña, (2016) apontaram $27,08 \pm 0,56 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$ de fenólicos e $47,35\% \pm 1,49$ de inibição do radical DPPH para suco de yacon sem adição de ácidos, mostrando valores semelhantes aos da amostra controle, $47,57 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$ e 52,87%. Não foram encontrados dados para comparar os resultados da análise ABTS para suco de yacon não misturado. O estudo mais próximo com suco de caju-yacon (DIONÍSIO et al., 2015), trouxe valores próximos de $3 \mu\text{M Trolox.g}^{-1}$, que se convertido em litros, é similar aos valores aqui encontrados, ligeiramente acima de $3 \mu\text{M Trolox.g}^{-1}$ para as amostras VA05 e VA1.

4.2.3 *Efeito do LBA no pH do suco de yacon*

Todas as amostras consideradas controle para tratamentos (do Controle ao PTI), sem adição de LBA, apresentaram valores de pH em torno de 6,0 (Tabela 3), o que é considerado crítico para a preservação de produtos refrigerados, onde os microorganismos psicotrópicos podem se desenvolver bem, e os mesófilos, mais lentamente. O LBA baixou o pH para cerca de 4,0 quando utilizado a 0,5% e pH 3,5 a 1%. Alimentos com pH abaixo de 4,6 são

considerados ácidos (MCGLYNN, 2019), portanto, o suco de yacon com LBA adicionado em ambas as concentrações pode ser considerado ácido e isso é essencial para a sua preservação.

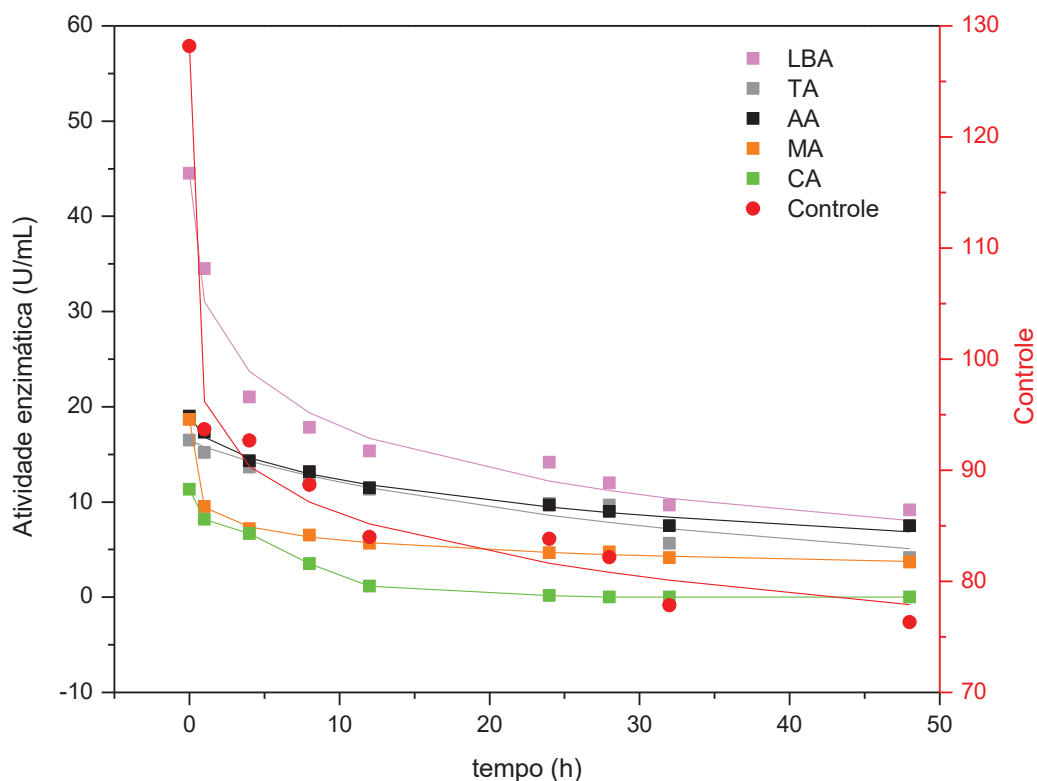
A literatura relata que o pH 4,6 é um valor de segurança para o não desenvolvimento de *Clostridium botulinum* em sua forma vegetativa e um padrão de estabilidade para sua toxina. Contudo, Raatjes e Smelt (1979) demonstraram que há crescimento vegetativo e presença de toxinas mesmo em pH 4,0. Portanto, um pH abaixo de 4,0 pode ser considerado mais seguro do ponto de vista microbiológico, favorecendo tratamentos A1 com LBA 1%.

Consequentemente, a combinação ideal de tratamentos encontrada foi 1% de LBA adicionado ao suco, branqueamento a vapor e sem imersão em 2,4% de ácido cítrico como PT (amostra VA1). Essas condições foram utilizadas em etapa subsequente para testar e comparar o efeito de diferentes ácidos orgânicos na cinética de PPOs e outras propriedades do suco de yacon.

4.3 A cinética das PPOs em suco de yacon

Em ordem decrescente de efetividade em inativar as PPOs do suco de yacon, o ácido cítrico (CA) apareceu em primeiro com 100%^a de redução de atividade; seguido do ácido málico (MA) 80,35%^b, LBA 79,40%^b, ácido tartárico (TA) 74,74%^b e ácido ascórbico (AA) 60,52%^b (Gráfico 5) sem diferença significativa. O efeito do branqueamento, pasteurização e refrigeração sem adição de ácido pode ser observado na amostra Controle, que estabeleceu 40.44%^c de redução. Vale ressaltar que o LBA reduziu quase a mesma porcentagem de atividade de PPO que MA e AT (Tabela 5), começando com uma atividade maior, 44,5 U.mL⁻¹, contra 18,67 U.mL⁻¹ e 16,50 U.mL⁻¹ respectivamente. Isso significa que o LBA iniciou com velocidade menor na degradação das PPOs, mas obteve resultados semelhantes no controle das enzimas.

GRÁFICO 5 - ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASES NO SUCO DE YACON EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ÁCIDOS



Controle (eixo Z; 40,44%^c de redução), tratamentos ácidos (eixo Y) e curvas ajustadas de Weibull: linhas retas com as mesmas cores. AA = ácido ascórbico (60,52%^b de redução); TA = ácido tartárico (74,74%^b); CA = ácido cítrico (100%^a); LBA = (79,40%^b) e MA = ácido málico (80,35%^b). FONTE: A autora (2019).

Pelos modelos ZO, FO e Weibull, foi possível calcular a meia-vida, que representa o tempo necessário para que a atividade da PPO caia 50% (Tabela 6). Devido à falta de ajuste, o modelo ZO não foi adequado para a avaliação do tempo de meia-vida usando o parâmetro k. Para Weibull e FO, cujos ajustes foram melhores, os resultados mostraram um perfil semelhante. Assim, segundo o modelo de Weibull, o tratamento sem adição de ácido (Controle) apresentou meia-vida extremamente longa, superior a quatro mil horas. Este resultado demonstrou que, para garantir a preservação do suco, o tratamento com ácido foi extremamente importante e pode garantir a rápida inibição das PPOs com a adição de MA, CA ou LBA, reduzindo o tempo de meia-vida para 3,9, 4,2 e 8,7 horas, respectivamente.

Tabela 5 – Cinética da atividade da PPO no suco de yacon de diferentes tratamentos ácidos

horas	Atividade de PPOs (U.mL ⁻¹)					
	CA	LBA	TA	MA	AA	Controle
0	11,333	44,500	16,500	18,667	19,000	128,167
1	8,167	34,500	15,167	9,500	17,333	93,667

Atividade de PPOs (U.mL ⁻¹)						
horas	CA	LBA	TA	MA	AA	Controle
4	6,667	21,000	13,667	7,167	14,333	92,667
8	3,500	17,833	12,500	6,500	13,167	88,667
12	1,167	15,333	11,333	5,667	11,500	84,000
24	0,167	14,167	9,833	4,667	9,667	83,833
28	0,000	12,000	9,667	4,750	9,000	82,167
32	0,000	9,667	5,667	4,167	7,500	77,833
48	0,000	9,167	4,167	3,667	7,500	76,333
Redução total	100,00% ^a	79,40% ^b	74,74% ^b	80,35% ^b	60,52% ^b	40,44% ^c

AA = ácido ascórbico; TA = ácido tartárico; CA = ácido cítrico; LBA = ácido lactobiónico e MA = ácido málico. ANOVA realizada e teste de Tukey ($p < 0,05$); $n = 3$. Letras diferentes em uma linha significam diferença significativa entre os tratamentos. FONTE: A autora (2019).

Além disso, a Tabela 6 mostra a comparação de erros e valores de R^2 encontrados para os diferentes modelos. Na avaliação dos modelos por diferentes erros e coeficientes de correlação (R^2), foi importante observar o que melhor se adaptou aos dados experimentais. Se apenas o MAE fosse calculado, ZO e PLS poderiam ser considerados os melhores modelos. Olhando os valores de R^2 e os outros erros, isto seria um erro consolidado. Os modelos PLS foram os melhores exemplos disto, pois não atingiram valores de R^2 superiores a 0,85. Além de R^2 , os erros RMSE, RMSEC e RMSECV dos modelos PLS apresentaram valores de 1,3 - 13,4, os maiores valores de erro entre os modelos estudados.

Avaliando os diferentes tratamentos, os menores erros foram obtidos pelo modelo Weibull, apresentando altos valores de R^2 ($> 0,92$), o que significa que o modelo representou bem os dados experimentais (Fig. 8). O RMSE é conhecido como métrica estatística padrão para medir quão bom é o desempenho do modelo em processos biotecnológicos (GERMEC; TURHAN, 2018). Para o modelo Weibull, os valores de RMSE apresentaram uma tendência de menores valores. Assim, o modelo de Weibull foi considerado o mais eficaz na descrição do comportamento de redução da atividade enzimática de PPOs em suco de yacon, com altos valores de R^2 , mostrando que suas equações representaram consistentemente os dados experimentais.

Tabela 6 – A cinética da atividade das PPOs no suco de yacon com os modelos Weibull, Ordem Zero, Primeira Ordem e PLS

Weibull							
Tratamentos	k	B	MAE	MRE	RMSE	t (1/2) h	R²
AA	0,022	0,547	0,035	0,336	0,442	32,090	0,983
Controle	0,000	0,142	0,007	0,633	1,817	4,512,530	0,983
TA	0,025	0,843	0,016	0,120	0,994	27,561	0,925
CA	0,163	0,886	0,041	0,429	0,633	4,248	0,978
LBA	0,079	0,402	0,008	0,138	1,823	8,740	0,971
MA	0,178	0,221	0,110	0,594	0,140	3,895	0,999
Ordem zero							
Tratamentos	k		MAE	MRE	RMSE	t (1/2) h	R²
AA	0,322		0,006	0,060	1,333	2,154	0,586
Controle	1,521		0,001	0,065	12,495	0,456	-
TA	0,284		0,001	0,016	4,839	2,438	0,881
CA	0,346		0,007	0,041	1,861	2,006	0,186
LBA	1,041		0,001	0,019	7,161	0,666	-
MA	0,451		0,002	0,014	3,721	1,535	-
Primeira ordem							
Tratamentos	k		MAE	MRE	RMSE	t (1/2) h	R²
AA	0,029		0,010	0,111	1,039	24,151	0,833
Controle	0,017		0,001	0,075	11,856	40,870	-
TA	0,027		0,013	0,122	0,516	25,893	0,926
CA	0,160		0,044	0,785	0,478	4,334	0,979
LBA	0,079		0,002	0,029	3,180	8,763	0,635
MA	0,145		0,004	0,020	1,901	4,792	0,271
PLS							
Tratamentos		MAE	MRE	RMSE	R²	RMSEC	RMSECV
AA		0,006	0,061	2,787	0,730	2,363	2,734
Controle		0,002	0,163	10,552	0,454	11,237	13,462
TA		0,011	0,097	1,337	0,851	1,621	1,927
CA		0,006	0,065	2,337	0,557	2,924	3,230
LBA		0,002	0,038	7,113	0,594	7,325	8,179
MA		0,005	0,041	3,231	0,370	4,057	4,460

AA = ácido ascórbico; TA = ácido tartárico; CA = ácido cítrico; LBA = ácido lactobiónico e MA = ácido málico.

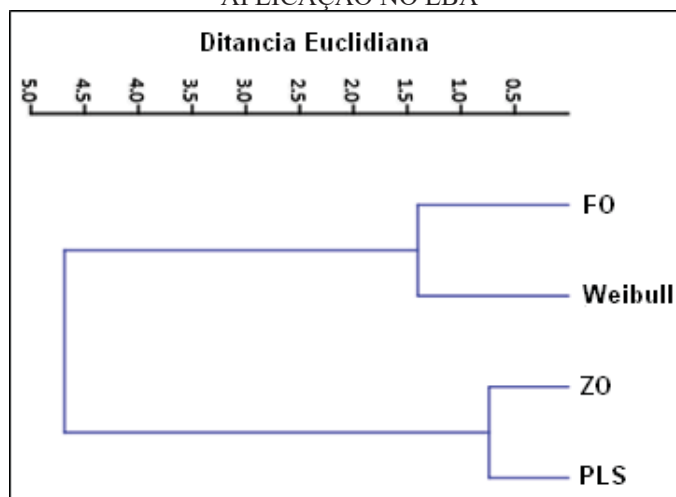
FONTE: A autora (2019).

O parâmetro β , de Weibull, indica o comportamento da curva e, para $\beta > 1$, a taxa de reação aumenta com o tempo e, portanto, a curva de degradação assume uma forma sigmoidal. Para $\beta < 1$, a taxa de reação diminui com o tempo e a taxa de degradação é muito alta no início do processo, como observado no presente estudo. O modelo de FO pode ser tratado como um caso especial do modelo Weibull, onde o parâmetro $\beta = 1$. O FO ($> 0,83$) destacou-se para AA, CA e TA. Para o LBA, os modelos Weibull e FO destacaram-se no HCA (Fig. 9), mas a correlação Weibull foi maior ($0,971 > 0,635$), fornecendo ao modelo maior confiabilidade.

Juntamente com o estudo de Lago e Noreña (2014), que elucidou a cinética das PPOs dos sucos de yacon em diferentes temperaturas de pasteurização, o presente trabalho complementa as informações sobre como controlar as enzimas que degradam a cor e os compostos bioativos,

apenas no armazenamento refrigerado e na aplicação de diferentes ácidos. O conhecimento das condições combinadas corretas é de extrema utilidade para manter a qualidade nutricional de um produto por mais tempo durante o armazenamento.

FIGURA 9 - *HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS* (HCA) DOS MODELOS MATEMÁTICOS UTILIZADOS PARA AJUSTAR OS DADOS DE ATIVIDADE DA PPO (DISTÂNCIA EUCLIDIANA) NA APLICAÇÃO NO LBA



Coefficiente cofenético: 0,949. FONTE: A autora (2019).

O modelo de Weibull é bom ao expor a inativação enzimática, pois representa a não linearidade do processo, até mesmo o desenvolvimento de resistência por parte das enzimas. Atualmente, este modelo é amplamente utilizado para inativação microbiana no processamento de sucos, e mostrou-se útil também em perfis enzimáticos, mas ainda com exemplos escassos na literatura (SREEDEVI; JAYACHANDRAN; RAO, 2019; SULAIMAN et al., 2015).

4.3.1 Tratamentos com ácidos

A eficiência dos diferentes ácidos testados no suco de yacon, e sua influência nos compostos bioativos e nas propriedades investigadas, pode ser observada nas Tabelas 7 e 8. O ácido cítrico, apesar de ser amplamente utilizado na indústria de alimentos, a qual representa 70% de seu consumo mundial (THERON; LUES, 2010), não foi o ácido com os maiores valores para DPPH, ABTS e fenólicos totais (Tabela 7). No entanto, é possível notar sua eficiência em diminuir o pH para valores próximos a 2,5, bem como o TA (Table 8).

O pKa dos ácidos utilizados explica a ordem dos valores de pH encontrados. Os valores mais baixos de pH correspondem aos valores mais baixos de pKa; ácido cítrico (3,13) e ácido tartárico (2,89); pois quanto menor o valor de pKa, mais forte é o ácido (THERON; LUES, 2010). O pKa do LBA é 3,60 (Cardoso et al., 2019), próximo do AA (4,10) e MA (3,46)

(THERON; LUES, 2010). Todos os ácidos testados foram capazes de baixar o pH abaixo de 4,0, com diferença significativa para a amostra controle.

Sem diferença significativa, as amostras de suco MA e TA apresentaram maior atividade antioxidante e teor total de fenólicos que o LBA, após 48 horas de armazenamento refrigerado do suco de yacon, o que suporta o potencial uso do LBA como conservante em produtos alimentícios. Em 48 h de armazenamento, o suco com LBA apresentou maior valor de compostos fenólicos ($1329,44 \pm 93,90 \mu\text{M GAE.L}^{-1}$) que o controle ($1249,56 \pm 53,38 \mu\text{M GAE.L}^{-1}$), demonstrando a manutenção dos compostos.

O LBA estabeleceu valores significativamente maiores que o Controle para ABTS e DPPH em 48 h (Tabela 7). Isso indica novamente que a estrutura do LBA atua como antioxidante dos radicais DPPH e ABTS, como demonstrado no estudo de Cardoso, Marques, Sotiles, et al. (2019) que avaliou o LBA em solução. As amostras MA e a TA tiveram um resultado semelhante. Os efeitos destes ácidos também podem ocorrer em sinergia com a matriz, conforme sugerido anteriormente. O mecanismo dessa sinergia deve ser melhor investigado.

Analisando os parâmetros de cor, mesmo sem diferença significativa entre MA e TA, a diferença de cor (Tabela 9) entre 24 e 48 h (ΔE) foi maior para o ácido tartárico (5,842), e o MA (2,461) manteve o parâmetro b^* (amarelo) e C^* (intensidade da cor) maiores que TA (Tabela 8). A amostra do LBA apresentou comportamento semelhante ($\Delta E = 2,183$) ao MA na preservação dos parâmetros de cores, com valores de b^* e C^* superiores ao TA. O suco com LBA deixou valores mais baixos de L^* , mas sem diferença significativa em relação à MA e TA, portanto não pode ser considerado mais escuro.

Mesmo que os ácidos málico e tartárico tenham se destacado nos compostos bioativos, em uma inspeção visual, o AT fez o suco parecer turvo. A adição de ácido tartárico nas bebidas é controlada na União Europeia, especialmente nos vinhos, pois diminui a estabilidade do tartarato (HALAMA; KOTALA; VRÁNA, 2015). Os vinhos já utilizam uma etapa de seu processamento para precipitação e remoção do ácido tartárico, devido a interferência na turbidez da bebida durante o armazenamento.

Além disso, ao facilitar a escolha entre os dois ácidos, o TA proporciona mais sabor ácido devido ao seu poder acidulante superior ao LBA e MA. O ácido málico, por outro lado, é conhecido por conferir um sabor suave e persistente (THERON; LUES, 2010) aos produtos alimentícios.

Tabela 7 – Resultados da capacidade antioxidante e do conteúdo fenólico do suco de yacon em diferentes tratamentos ácidos

Amostra	DPPH (µM Trolox.L ⁻¹)			ABTS (µM Trolox.L ⁻¹)			Fenólicos totais (µM GAE.L ⁻¹)		
	Inicial	24 horas	48 horas	Amostra	Inicial	24 horas	48 horas	Amostra	Inicial
CA	1319,67 ^{ab} ± 89,52	1143,98 ^{ba} ± 96,10	754,86 ^c ± 86,55	1407,83 ^{ba} ± 24,99	1267,93 ^{ab} ± 32,11	1282,32 ^{ab} ± 60,09	1535,67 ^{ab} ± 14,12	1371,22 ^{ab} ± 95,18	1165,67 ^{abc} ± 83,37
MA	1713,19 ^a ± 92,28	1368,06 ^{ba} ± 52,22	1173,61 ^c ± 92,70	1831,82 ^{ba} ± 46,32	1747,22 ^{ba} ± 66,56	1614,14 ^{ba} ± 68,97	2388,44 ^{ba} ± 63,53	2215,67 ^{ba} ± 64,59	2236,78 ^{ba} ± 49,60
LBA	1603,26 ^a ± 129,77	1294,82 ^{ba} ± 44,36	1192,73 ^{ab} ± 42,43	1726,89 ^{ba} ± 32,17	1679,80 ^{ba} ± 38,75	1622,85 ^{ba} ± 74,70	1555,17 ^{ab} ± 29,72	1535,67 ^{ab} ± 50,33	1329,44 ^{abc} ± 93,90
TA	1558,10 ^a ± 83,55	1494,44 ^a ± 146,85	1142,13 ^{ba} ± 54,73	1753,28 ^a ± 96,57	1501,52 ^{ab} ± 75,60	1606,56 ^a ± 14,56	2285,11 ^a ± 81,25	2100,67 ^a ± 96,56	2172,89 ^{ab} ± 52,19
Controle	933,33 ^{ab} ± 158,08	605,09 ^{bb} ± 169,21	572,22 ^{bc} ± 18,51	1402,52 ^{ba} ± 30,33	1148,48 ^{ab} ± 57,38	1094,19 ^{ab} ± 34,99	1675,67 ^{ab} ± 37,96	1243,44 ^{ab} ± 91,03	1249,56 ^{acd} ± 53,38
AA	1488,88 ^a ± 14,63	1247,92 ^{aba} ± 30,69	941,87 ^{bbc} ± 242,80	1244,04 ^a ± 9,79	1137,37 ^{ab} ± 11,19	716,52 ^{bc} ± 11,39	1484,58 ^{ab} ± 29,46	1188,75 ^{ab} ± 88,38	1010,00 ^{bd} ± 78,56

ANOVA realizada e teste de Tukey p <0,05; n = 5. Letras maiúsculas diferentes em uma coluna demonstram diferença significativa entre os tratamentos com ácido em um mesmo dia de análise. Letras diferentes em uma linha denotam diferença significativa entre os dias. AA = ácido ascórbico; TA = ácido tartárico; CA = ácido cítrico; LBA = ácido lactobiónico e MA = ácido málico. FONTE: A autora (2019).

Tabela 8 – Resultados do pH e cor do suco de yacon em diferentes tratamentos ácidos

pH	L*			a*			b*		
	Amostra	Inicial	24 horas	48 horas	Amostra	Inicial	24 horas	48 horas	Inicial
CA	2,50 ^{de} ± 0,01	2,58 ^{ad} ± 0,09	2,63 ^{ad} ± 0,02	19,49 ^a ± 0,31	10,71 ^a ± 0,43	10,62 ^a ± 0,45	-0,86 ^{bab} ± 0,08	-0,39 ^{ab} ± 0,04	-1,24 ^{bb} ± 0,20
MA	2,66 ^{bd} ± 0,01	2,77 ^{ac} ± 0,03	2,80 ^{ac} ± 0,06	17,57 ^{aba} ± 0,41	20,72 ^a ± 0,40	13,81 ^{ba} ± 0,52	-0,15 ^{ab} ± 0,19	-1,11 ^{ab} ± 0,30	-0,58 ^a ± 0,27
LBA	3,71 ^{ab} ± 0,01	3,45 ^{bb} ± 0,02	3,50 ^{bbc} ± 0,02	11,41 ^{ba} ± 0,21	9,78 ^{aba} ± 0,48	7,76 ^{ba} ± 0,36	1,60 ^a ± 0,39	1,54 ^a ± 0,29	0,73 ^a ± 0,47
TA	2,38 ^{ef} ± 0,03	2,43 ^{abE} ± 0,04	2,48 ^{ad} ± 0,01	18,94 ^{aba} ± 0,33	19,68 ^a ± 0,48	14,47 ^{ba} ± 0,46	-0,16 ^a ± 0,15	-0,68 ^{ab} ± 0,08	-0,45 ^a ± 0,34
Controle	6,14 ^a ± 0,05	5,99 ^{ba} ± 0,01	6,03 ^{ba} ± 0,03	0,10 ^{ab} ± 0,01	0,09 ^{ab} ± 0,00	0,09 ^{ab} ± 0,01	0,13 ^a ± 0,04	0,00 ^{ab} ± 0,00	0,02 ^{ab} ± 0,03
AA	3,14 ^c ± 0,02	3,39 ^{ab} ± 0,01	3,25 ^{bbc} ± 0,01	12,97 ^{ba} ± 0,26	19,09 ^a ± 0,29	15,04 ^{aba} ± 0,35	-1,88 ^{ab} ± 0,04	-2,25 ^{ab} ± 0,06	-1,91 ^{ab} ± 0,13

ANOVA e teste de Tukey para pH (p <0,05) e Kruskal-Wallis para cor L* a* b* (p <0,05); n = 5. Letras maiúsculas diferentes em uma coluna demonstram diferença significativa entre os tratamentos com ácido em um mesmo dia de análise. Letras diferentes em uma linha denotam diferença significativa entre os dias. AA = ácido ascórbico; TA = ácido tartárico; CA = ácido cítrico; LBA = ácido lactobiónico e MA = ácido málico. FONTE: A autora (2019).

Tabela 9 – Resultados dos parâmetros de cor e ΔE do suco de yacon em diferentes tratamentos ácidos

Amostra	C*			ΔE		
	Inicial	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	
CA	5,439 ^{AB} $\pm$ 0,290	7,347 ^{AB} $\pm$ 0,555	7,705 ^A $\pm$ 0,376	9,007	0,902	
MA	8,513 ^A $\pm$ 0,212	9,216 ^A $\pm$ 0,535	6,423 ^{AB} $\pm$ 0,323	1,351	2,461	
LBA	2,909 ^{AB} $\pm$ 0,043	6,317 ^{AB} $\pm$ 0,617	6,205 ^{AB} $\pm$ 0,028	2,059	2,183	
TA	7,663 ^{AB} $\pm$ 0,076	7,923 ^{AB} $\pm$ 0,123	5,286 ^{AB} $\pm$ 0,350	0,934	5,842	
Controle	0,141 ^B $\pm$ 0,020	0,000 ^B $\pm$ 0,000	0,020 ^B $\pm$ 0,026	0,128	0,017	
AA	6,933 ^{AB} $\pm$ 0,707	5,786 ^{AB} $\pm$ 0,250	5,992 ^{AB} $\pm$ 0,625	6,279	4,075	

- Significa valores zero que impossibilitaram o cálculo.

O teste de Kruskal-Wallis foi feito ($p < 0,05$); $n = 3$. Letras maiúsculas diferentes em uma coluna demonstram diferença significativa entre os tratamentos em um mesmo dia de análise. AA = ácido ascórbico; TA = ácido tartárico; CA = ácido cítrico; LBA = ácido lactobiónico e MA = ácido málico. FONTE: A autora (2019).

Os ácidos orgânicos são amplamente utilizados para acidificar sucos, principalmente porque estão presentes naturalmente na matéria-prima (THERON; LUES, 2010). Os ácidos málico, tartárico e cítrico estão naturalmente presentes na bebida yacon, de acordo com Lee et al. (2010) que investigaram estes ácidos durante a fermentação do vinagre de yacon. De acordo com Theron and Lues (2010) o ácido málico e seus sais foram confirmados como GRAS pelo FDA (*Food and Drug Administration*), incentivando sua aplicação como intensificador de sabor, acidulante, agente de controle de pH quando utilizado de 0,7 a 6,9% em vários produtos alimentícios. Lembrando que, na atividade de PPOs de suco de yacon, o MA inibiu 80,35% da atividade enzimática, seguido pelo LBA e TA.

A combinação de dados obtidos para os diferentes tratamentos com ácidos mostrou que os ácidos málico, tartárico e LBA foram eficazes na preservação das principais propriedades e cor do suco de yacon refrigerado nas primeiras 48 horas de armazenamento refrigerado. Na concentração de 1%, eles mantiveram compostos bioativos com possíveis propriedades enriquecedoras. O LBA e o MA foram as melhores opções para preservar o suco de yacon refrigerado. Estudos usando um tempo de armazenamento mais longo podem complementar os resultados encontrados.

Além disso, o LBA mostrou propriedades conservantes, antioxidantes e acidificantes adequadas para um ingrediente alimentar. Recentemente, sua atividade quelante, solubilidade e propriedades térmicas foram investigadas (BISINELLA et al., 2017; CARDOSO et al., 2019b), demonstrando amplas possibilidades de aplicação na indústria de alimentos. Uma patente da Kraft Foods Comp. (BALDWIN et al., 2010) indicou que nas bebidas o LBA se complexa com outros ácidos, integrando minerais, contribuindo para a composição dos alimentos. Juntamente com os resultados do presente estudo, esta patente corrobora o potencial do LBA na fortificação de alimentos, que vai muito além da conservação no armazenamento.

Outras patentes demonstraram o uso de LBA em alimentos, como em produtos cárneos, para retenção de água, por ser um aditivo higroscópico. Pensando pelo mesmo motivo, pode ser aplicado em produtos de panificação, para reduzir os efeitos do tempo na perda de água da massa, além dos lácteos, para acidificação e também reposição de lactose, usando enzimas para converter lactose em LBA. No entanto, os reguladores de aditivos alimentares são cuidadosos com a liberação do LBA, uma vez que o método tradicional de produção é eletrolítico e isso pode deixar resíduos metálicos no LBA ao final do processo. Atualmente, a produção de LBA por rota biotecnológica já está bem estabelecida, e sua liberação para uso em alimentos apenas aumentaria sua produção, tornando o processo mais barato e, conseqüentemente, mais viável (CARDOSO et al., 2019a).

Dos ácidos testados aqui, o LBA seria o mais caro (US \$ 126 USD/kg), seguido de tartárico (US \$ 19,1 USD/kg) > málico (US \$ 2-5 USD/kg) > cítrico (US \$ 1 USD/kg) (PHARMACOMPASS, 2020). Tendo em vista o potencial já conhecido do LBA, como acidificante, antioxidante, quelante, antimicrobiano, retentor de água (CARDOSO et al., 2019b); adicionado aos pouco explorados, de prebiótico, enriquecedor de cálcio nas bebidas e estimulador de gosto doce e ácido; estes já são motivos suficientes para estudar o LBA, considerar sua inserção como um aditivo legal após o estabelecimento da toxicologia e, em seguida, testar a percepção e aceitabilidade sensorial de sua inserção em produtos alimentícios.

4.4 Conclusões

Como raiz do yacon, o seu suco escureceu rapidamente sem nenhum tratamento. Os tratamentos combinados que se destacaram na produção de suco de yacon foram o branqueamento a vapor (10 min) com adição de 1% de LBA. Essa combinação obteve os maiores resultados de compostos bioativos (DPPH, ABTS e fenólicos), além do pH dentro da faixa ideal de segurança alimentar e estabilidade de cores em 48 h de armazenamento refrigerado.

Mesmo com o branqueamento, a pasteurização, a subsequente refrigeração, e os diferentes ácidos mostraram um efeito imperativo na cinética das PPOs. O ácido cítrico na concentração de 1% foi capaz de desativar completamente as PPOs, mas não apresentou desempenho preeminente em manter os compostos bioativos. Além disso, entre os quatro modelos testados para descrever a cinética enzimática, o modelo de Weibull se destacou com os maiores coeficientes de correlação ($> 0,92$).

Considerando o conjunto de fatores, cinética enzimática mais compostos bioativos, pH e estabilidade da cor, o LBA não mostrou diferença significativa do ácido málico, demonstrando desempenho adequado na conservação do suco de yacon. O ácido lactobiônico demonstrou eficiência na acidificação, conservação de compostos bioativos e potencial de enriquecimento no suco de yacon. Estes resultados incentivam novas pesquisas sobre o LBA, e isso aumentaria sua produção, baratearia o custo atual do LBA, colocando-o nos radares para obter a permissão como aditivo alimentar.

Os resultados obtidos são importantes para a indústria alimentícia do processamento de sucos, especialmente considerando fontes não convencionais como yacon e um ingrediente potencial, o LBA. A combinação correta de tratamentos (calor + ácido + conservação refrigerada) perpetrará a manutenção eficaz dos compostos bioativos e da cor do suco de yacon.

Para complementar ainda mais as informações expostas aqui, estudos futuros podem se concentrar na percepção desses tratamentos sobre a qualidade sensorial do suco de yacon e também sobre seu efeito prebiótico.

CAPÍTULO 5 – Comparação das propriedades do ácido málico com as do LBA

5.1 Introdução e hipóteses⁷

O ácido málico é um pó cristalino branco, altamente solúvel em água, contendo três hidroxilas em sua estrutura química. Aparece em quantidades relativamente altas em várias frutas e vegetais, enquanto apenas o isômero L existe naturalmente. O DL-ácido málico racêmico é produzido comercialmente por hidratação do anidrido maleico sob alta temperatura e pressão para formar os ácidos málico e fumárico.

Os regulamentos listam o ácido málico como aditivo alimentar, acidificante e conservante na União Europeia - E296 (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2014) sem restrições. No Brasil (BRASIL, 2010), é permitido como regulador de acidez e sequestrante, com restrições para massas e vinagres. Os relatórios da FDA, (2019) listam o ácido málico como intensificador de sabor, agente aromatizante, adjuvante e agente de controle de pH, com proibição de alimentos para bebês e limitações para outros produtos alimentícios, como 3,4% em bebidas não alcoólicas, 3,5% em sucos de frutas e 0,7% em todas as outras categorias de alimentos, além disso ele é reconhecido como seguro (GRAS) para consumo. Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (2014), existem reservas quanto à eficácia do ácido málico na preservação de alimentos/rações com menos de 12% de umidade durante o armazenamento.

Na maioria dos frutos, o ácido málico é o ácido orgânico predominante, seguido pelo ácido cítrico (WANG et al., 2018). Estudos apontam alguns benefícios atribuídos ao ácido málico, que podem ser de grande valor em produtos alimentícios. A alta atividade que inibe as enzimas α -glucosidase, α -amilase e lipase (ALAKOLANGA et al., 2015); síntese de hidrogéis sem alteração estrutural do amido de milho (LEE et al., 2019); qualidade sensorial, estabilidade física, bioquímica e microbiana do vinho, diretamente relacionada à regulação do pH (VOLSCHEK; VAN VUUREN; VILJOEN-BLOOM, 2017); controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes da superfície do queijo com biofilmes (PINTADO; FERREIRA; SOUSA, 2010), são alguns deles.

Vale ressaltar que o ácido málico não é classificado como texturizante pela legislação. No entanto, de acordo com um relatório técnico (POLYNT, 2019) e alguns sites como

⁷ Deste Capítulo 5, surgiu o artigo publicado na Revista **Arabian Journal of Chemistry** (*Open access*): MARQUES, C. et al. *Full physicochemical characterization of malic acid: Emphasis in the potential as food ingredient and application in pectin gels*, v. 13, Issue 12, December 2020, Pages 9118-9129.

Bakerpedia, (2020), o ácido málico tem vários outros usos alegados, em alimentos. Vale ressaltar: as bebidas enriquecidas com cálcio adicionadas com ácido málico com atividade quelante; a capacidade de formar quelatos estáveis de ferro/cálcio que impedem a precipitação de sais de ferro/cálcio; o baixo ponto de fusão que é preferível em balas; o gosto ácido/amargo suave que pode potencializar alguns sabores e mascarar outros; a textura e estabilidade do gel de pectina devido à sua capacidade de tamponamento; antioxidante em óleos e gorduras e inibidor de mofo para produtos de panificação. Uma das alegações tem resultados quantitativos em trabalhos científicos, a atividade quelante de ferro, onde Nadeau e Clydesdale, (1986) apresentaram resultados em flocos de cereais e Keykhosravi et al., (2016) mostraram um efeito não significativo em cogumelos.

Em perspectiva para 2025, a indústria de ácido málico alcançará US\$ 257,7 mi, emergindo os setores de panificação, confeitaria e bebidas. Atualmente, apenas 21% do ácido málico fabricado é para a indústria de alimentos, além disso, alimentos para animais de estimação, cuidados pessoais e produtos médicos compartilham o valor restante (RESEARCH AND MARKETS, 2019). As indústrias têm usado o ácido málico como aditivo alimentar nos Estados Unidos (EUA) e na Europa (KWON et al., 2019), embora o ácido cítrico seja ainda mais utilizado na indústria de alimentos como acidificante devido ao sabor pronunciado e frutado, preço baixo e alta disponibilidade (BATT; TORTORELLO, 2014). Por outro lado, o ácido málico confere sabor suave, capaz de mascarar os sabores dos adoçantes artificiais (HUI, 2005; THERON; LUES, 2010).

Existem poucos estudos sobre o comportamento do ácido málico em alimentos, como o LBA, nenhum focado em resultados quantitativos ou investigações sobre suas propriedades físico-químicas, úteis para a indústria alimentícia, ou mesmo na confirmação de suas propriedades quelante de cálcio, texturizantes e antioxidantes. O objetivo aqui foi avaliar a maioria das propriedades físico-químicas do ácido málico, sólido e em solução, que poderiam ser úteis para a indústria alimentícia, considerando os bons resultados no Capítulo 4.

Assim, as hipóteses a serem testadas neste Capítulo foram:

1. O ácido málico possui realmente propriedades quelantes de cálcio, texturizantes e antioxidantes quando em solução;
2. As principais propriedades do ácido málico são comparáveis as propriedades encontradas para o LBA e algumas propriedades de ambos são superiores as do ácido cítrico, o ácido de maior comercialização;
3. Associando os possíveis usos, LBA e ácido málico podem substituir o ácido cítrico em determinados empregos.

A estrutura deste capítulo foi feita como um quadro para melhor comparação e compreensão. A discussão está no quadro abaixo de cada análise.

5.2 LBA Vs. Ácido málico

Análise: Ponto de fusão

LBA: 113-118 °C

Ácido málico: 129,71 °C

Essa diferença é particularmente interessante na produção de doces duros e consistentes, onde o comportamento ácido começa a agir antes do pico de temperatura do processo. Isto torna a produção mais rápida e, além disso, reduzindo os custos de energia, pois não é necessário atingir temperaturas próximas a 150 °C. Na indústria deste tipo de produto o ácido cítrico é dominante, também devido ao seu gosto ácido, porém seu ponto de fusão é em torno de 153 °C. Além disso, o ácido cítrico tem um sabor ácido mais forte, o ácido málico é conhecido como um fornecedor de sabor mais suave (BAKERPEDIA, 2020; POLYNT, 2019) e o LBA é considerado até um pouco doce (SARENKOVA; CIPROVICA, 2018), o que poderia contribuir para redução de açúcar nestes produtos.

Análise: Higroscopicidade

LBA: 54 g.mol⁻¹

Ácido málico: 8,7 g.mol⁻¹

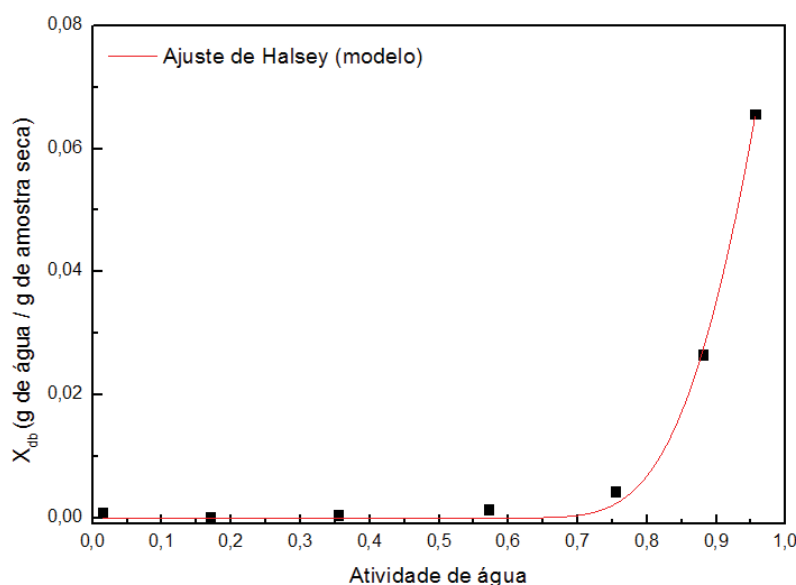
O ácido DL-málico apresentou 8,7 g.mol⁻¹ de higroscopicidade, comparável ao sorbitol (14 g.mol⁻¹), ácido glicólico (4 g.mol⁻¹) e ácido cítrico (8 g.mol⁻¹). Assim, o ácido málico não figura como ingrediente alimentar adequado para manter a umidade em alimentos sólidos. Isso está relacionado à sua estrutura química, formada por três grupos hidroxila e dois oxigênios capazes de formar ligações de hidrogênio. Ao contrário do que ocorre com o LBA, com nove hidroxilas e capaz de absorver 54g.mol⁻¹ de água.

Este caráter do DL – ácido málico foi devidamente confirmado pela isoterma de sorção (Gráfico 6), onde, mesmo em altos valores de atividade de água (próximo de 1), a umidade de equilíbrio é menor que 0,07 g de água por g da amostra. A isoterma de umidade também foi ajustada pelo modelo de Halsey, que depende de dois parâmetros (A = 2,34 e B = 3,38), apresentando um coeficiente de correlação de 0,998.

Possíveis aplicações: O uso do LBA seria restrito a produtos nos quais a retenção e a absorção de umidade do ambiente são desejáveis, mesmo que a embalagem seja uma barreira com o ambiente, ele terá a capacidade de retenção de água. Assim, o LBA eventualmente atua como um agente de textura nos alimentos e nas condições mencionadas, a aplicação do LBA seria desejável em produtos assados, sobremesas, laticínios e cárneos. Além disso, os alimentos onde se deseja manter a crocância o ácido málico é aplicável, como cereais extrusados, biscoitos, flocos, produtos assados e batatas pré-fritas.

Embora a eficiência do ácido málico em alimentos com baixa umidade seja questionável (<12%) (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2014), isto é uma dúvida em qualquer produto de baixa umidade, pois quanto menor a umidade, menor a quantidade de água que o ácido conservante se solubilizará e atuará nos alimentos. Assim, o ácido málico, que possui baixa higroscopicidade, ajuda a manter a textura dos produtos alimentares. Como ingrediente, esta propriedade facilita o armazenamento por longos períodos, sem problemas de aglomeração. Adicionalmente, o baixo caráter higroscópico é uma propriedade interessante para a aplicação industrial, considerando que não é necessário trabalhar com atmosfera modificada ou na ausência de umidade.

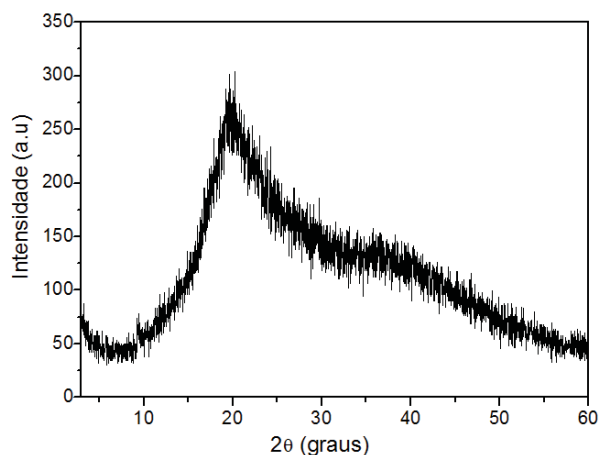
GRÁFICO 6 - ISOTERMA DE SORÇÃO DE UMIDADE DO ÁCIDO DL-MÁLICO A 30 °C



FONTE: A autora (2020).

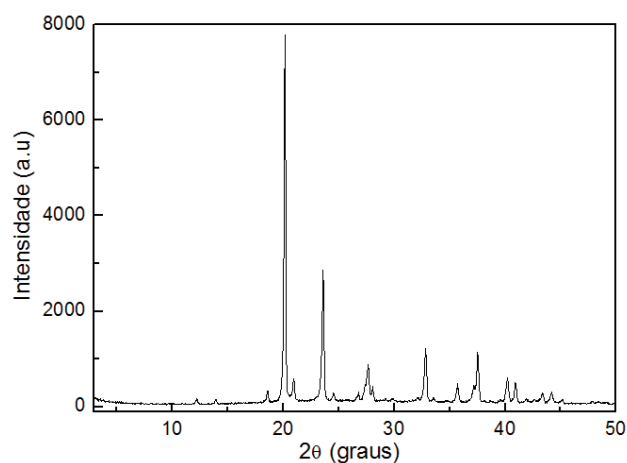
Análise: DRX

GRÁFICO 7 - PADRÃO DE DRX OBTIDO PARA O LBA.



FONTE: Traduzido e adaptado de CARDOSO et al., (2019b).

GRÁFICO 8 - PADRÃO DE DRX OBTIDO PARA O ÁCIDO DL-MÁLICO.

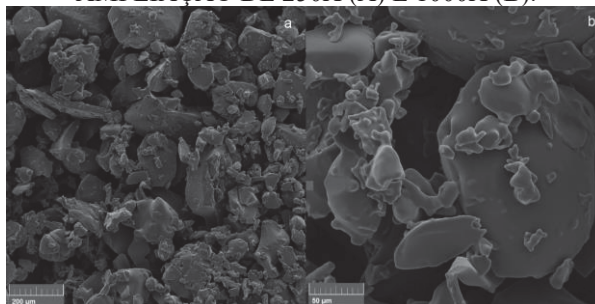


FONTE: A autora (2020).

A análise de difração de raios-X (Gráfico 7) do LBA mostrou que o composto era não cristalino, devido à presença do halo amorfo e à ausência de picos intensos e definidos. Este fato pode ser explicado pela alta higroscopicidade do LBA, mesmo ele tendo sido seco antes da análise. O difratograma de raios-X da amostra de ácido DL-málico (Gráfico 8) mostrou padrão de cristalinidade, com picos intensos, estreitos e bem definidos. Este fato também pode ser explicado pela baixa higroscopicidade do composto.

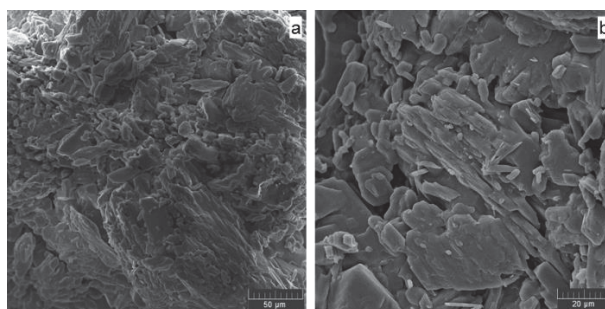
Análise: MEV

FIGURA 10 - IMAGENS DE LBA OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM AMPLIAÇÃO DE 250X (A) E 1000X (B).



FONTE: CARDOSO et al., 2019b.

FIGURA 11 – IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM AMPLIAÇÃO DE 1000X (A) E 2000X (B).



FONTE: A autora (2020).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 11) mostraram que a amostra de DL- ácido málico contém partículas com diversas morfologias e sem forma definida, assim como o LBA (CARDOSO et al., 2019b). A ampliação também mostrou que as partículas de DL – ácido málico são menores em média, pois necessitaram o dobro de aumento para o mesmo resultado do LBA (Figura 10), e também contém mais irregularidades na superfície. Isto explica em partes a maior solubilidade do ácido málico.

Análise: Solubilidade

LBA: 400 mg.mL⁻¹ (40%) de LBA em água deionizada, 1 hora de repouso em temperatura de 18 °C sem precipitação posterior.

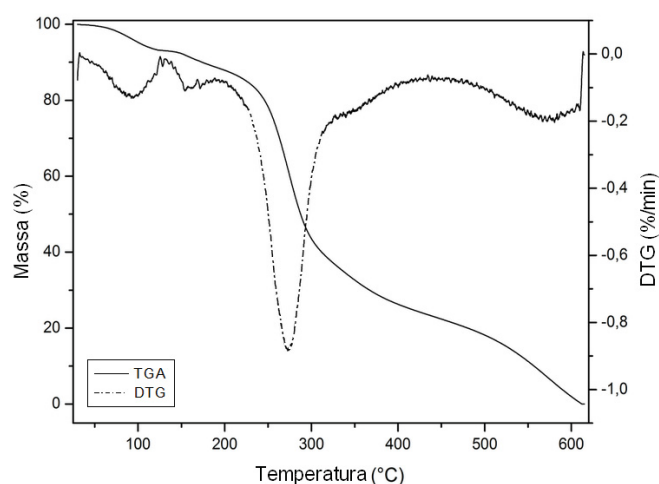
Ácido málico: A alta solubilidade do DL-ácido málico foi confirmada pelo teste realizado de 10 - 55 °C. À temperatura ambiente (25°C), foi possível solubilizar 50,11% ou 5,011g/10 mL de água.

Sua solubilidade permite uma ampla aplicação do LBA na indústria de alimentos, bem como no aumento da solubilidade de compostos fontes de Ca para enriquecimento de produtos. No

entanto, o valor obtido para a solubilidade do LBA corresponde a $1,12 \text{ mol.kg}^{-1}$ de água, inferior à solubilidade de outros aditivos alimentares como NaCl, frutose, ácidos cítrico, málico e sacarose. O DL-ácido málico apresentou uma solubilidade de $3,73 \text{ mol.kg}^{-1}$ de água (25°C), superior ao ácido cítrico (cerca de $3,13 \text{ mol.kg}^{-1}$ de água na mesma temperatura). Sua alta solubilidade permite várias aplicações na indústria de alimentos, especialmente bebidas. A sua solubilidade nas temperaturas testadas por ser conferida na Tabela 1 do APÊNDICE B.

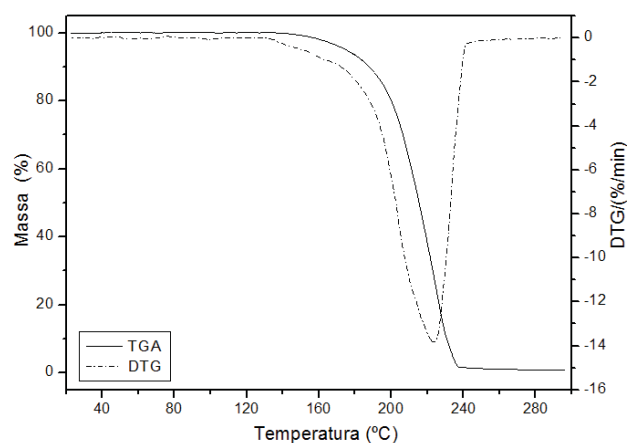
Análise: TGA/DTG

GRÁFICO 9 – CURVAS TGA/DTG PARA O LBA.



FONTE: Traduzido e adaptado de CARDOSO et al., (2019b).

GRÁFICO 10 – CURVAS TGA/DTG PARA DL-ÁCIDO MÁLICO.



FONTE: A autora (2020).

As curvas TGA / DTG do ácido lactobiônico (Gráfico 9) mostram quatro eventos de perda de massa. A primeira entre $30\text{-}132^{\circ}\text{C}$, com uma perda de massa de $7,18\%$, o que corresponde à desidratação da amostra. O segundo evento entre $132\text{-}195^{\circ}\text{C}$ ($4,56\%$). A terceira e mais

importante entre 195-460 °C (66,79%) e depois 470-610 °C (21,41%), sendo estes três associados à decomposição da matéria orgânica.

Considerando isto, o LBA pode participar de vários processos unitários da indústria de alimentos como: pasteurização que atinge de 65 °C (lento) a 135 °C (UHT), alimentos branqueados (98-100 °C) por imersão ou vapor, alimentos enlatados e comercialmente estéreis, como vegetais (121 °C), minimamente processados ou desidratados osmoticamente (temperatura ambiente ou de refrigeração). Todos estes processos participariam do primeiro evento de perda de massa. Contudo ainda outras várias possibilidades se apresentam como em alimentos fritos e pré-fritos (150-190 °C), assados (177 °C e acima), com um pouco mais de perda de massa. Entretanto, as aplicações que envolvem imersão devem ser estudadas mais a fundo para avaliar perdas por lixiviação. Em produtos assados, a higroscopicidade do LBA pode não ser bem aceita (CARDOSO et al., 2019b).

As curvas TGA/ DTG do ácido málico são fornecidas no Gráfico 10, e como pode ser visto, não há significativos eventos de perda de massa na região de 100 °C, indicando a falta de umidade no composto. Apenas um evento de perda de massa em ambas as curvas é facilmente percebido a partir de 140 °C, o que corresponde à degradação do ácido málico, da matéria orgânica.

A temperatura de degradação evidenciada pelas curvas TGA / DTG indica que o ácido málico tem a capacidade de ser aplicado em vários produtos alimentícios, em operações entre 140 e 200 °C. Alimentos minimamente processados e refrigerados podem se beneficiar das propriedades do ácido málico sem degradação. Assim como discutido para o LBA, alimentos branqueados, por imersão ou vapor, também se beneficiariam com uma etapa anterior de imersão em ácido málico, mas a perda na imersão deve ser investigada para confirmar custo/benefício.

Em processos acima de 140 °C, de acordo com Robin e Palzer, (2015) produtos crocantes como cereais extrusados atingem 270 °C se usada a extrusão de paletes, 100 °C se aplicada a extrusão a vácuo e 180 °C com o método de cozimento por extrusão. No primeiro caso, a temperatura aplicada degradaria a estrutura do ácido málico, embora 270 °C seja a terceira etapa do processo e durante os dois primeiros, 100 °C e 60 °C, o ácido málico ajudaria na conservação da mistura. Neste caso, de produtos crocantes, o LBA não seria uma boa escolha devido sua higroscopicidade.

Os produtos fritos com baixo risco de formar acrilamida, usando temperaturas de 140-180 °C, poderiam aplicar ácido málico sem perda de massa acima de 20%. Os produtos fritos com

temperaturas superiores, até 210 °C (HAASE, 2006), resultariam em 80% ou mais de perda de ácido málico, portanto seu benefício duraria até o momento da fritura. Considerando os produtos amiláceos, submetidos ao processo de congelamento, o ácido málico ajudaria mesmo no processo de descongelamento, não absorvendo muita umidade, além de batatas prontas para fritar, contribuindo com um produto frito crocante. Os produtos assados, atingindo 180 °C, estariam na faixa de temperatura que o ácido málico perde até 20% de massa. Assim, seus benefícios também poderiam ser contabilizados.

Análise: Potencial antioxidante

LBA: Método DPPH, os resultados variaram entre 24% de inibição do radical (solução 40%) e 3% (solução 1%).

Ácido málico: Os resultados do DPPH mostraram diferença significativa entre as soluções de ácido málico, e mesmo a solução a 1% obteve mais de 20% de inibição do radical DPPH (APÊNDICE B – Tabela 2).

Análise: Potencial quelante

LBA:

Cálcio: 15% (solução 40%)

Ferro: de 3-54% (solução 1-40%)

Ácido málico:

Cálcio: 15-62% (solução 1-60%)

Ferro: 8-94% (solução 1-60%)

Análise: Antibacteriano

LBA: Todas as bactérias foram resistentes (Halos < 12 mm; CLSI, 2012). Halos de no máximo 11mm para *S. aureus* no LBA em solução de 40%.

Ácido málico: De acordo com o CLSI (2012), *Salmonella* foi suscetível (Halos > 17 mm) à solução de ácido málico a 60% e inibido de modo intermediário pela de 40%. *S. aureus* e *E. coli* foram inibidos apenas por soluções a 60% e 40% (Halos de 12-17 mm; intermediário).

O LBA possui 9 grupos ativos de -OH, que podem realizar essa atividade antioxidante e, adicionalmente, uma estrutura cíclica que pode auxiliar e estabilizar o deslocamento de elétrons. O ácido málico possui 5 grupos ativos, porém, com uma molécula menor. A concentração de 40% de LBA já é uma solução bem viscosa, assim como a de 60% de ácido málico. A

capacidade quelante no LBA ocorreu em diferentes concentrações para o íon ferro. Enquanto para o íon cálcio, a capacidade foi confirmada apenas na concentração de 40%. Os resultados obtidos para o quelante de ferro, quando correlacionados com as porcentagens de inibição antioxidante, levou a uma alta correlação de Pearson (quelante de ferro:DPPH = 0,954), o que corrobora a hipótese de que a atividade antioxidante está altamente relacionada à capacidade quelante dos metais (CARDOSO et al, 2019b).

O ácido málico mostrou propriedades quelantes substanciais, o que permite a formação de complexos estáveis com metais. As atividades quelantes propiciam o uso de ácido málico, para quelar metais como ferro e cálcio, além da ação antioxidante. Também é possível notar que a atividade quelante de ferro se destaca após a concentração de 10% e, mesmo na solução de 1%, as atividades não podem ser negligenciadas. Na solução a 1%, a quelação de ferro manteve 8,35% de atividade e a quelação de cálcio, 15,79%. Os resultados do DPPH mostraram diferença significativa entre as soluções de ácido málico, e mesmo a solução a 1% obteve mais de 20% de inibição do radical DPPH (APÊNDICE B – Tabela 2).

Resultados parecidos para o ácido cítrico não foram encontrados para comparação. Mesmo assim, o ácido cítrico é usado em óleos comestíveis, como quelante de metal e antioxidante, para evitar ou retardar a rancidez (AKARANTA; AKAHO, 2012). Assim, o ácido málico pode ser aplicado com o mesmo objetivo. A baixa higroscopicidade, além disso, ajuda a sua aplicação em óleos. JO LBA, se comparadas as mesmas soluções 10 e 40% com o ácido málico, demonstrou menores atividades antioxidante e quelante de ferro e cálcio (Gráfico 11). E isso pode justificar o resultado também inferior para a atividade antibacteriana. Além disso, sua alta higroscopicidade dificultaria aplicação em óleos.

Essa propriedade de quelar íons metálicos, pode eliminar a turbidez de bebidas, causada por sais de ferro/cálcio. Um outro exemplo de aplicação seriam as bebidas fortificadas. Duas patentes mencionam misturas ácidas para fortalecer bebidas, uma bebida modelo e uma bebida láctea, aplicando 0,38 a 3,66% de ácido málico, respectivamente (CALAPINI; VALENCIA; DEE, 2006; LUHADIYA; YANG; HEISEY, 2006). O LBA também tem patente como fortificante de bebidas (BALDWIN et al., 2010). Não foram mencionados resultados quantitativos da atividade quelante em nenhum dos casos.

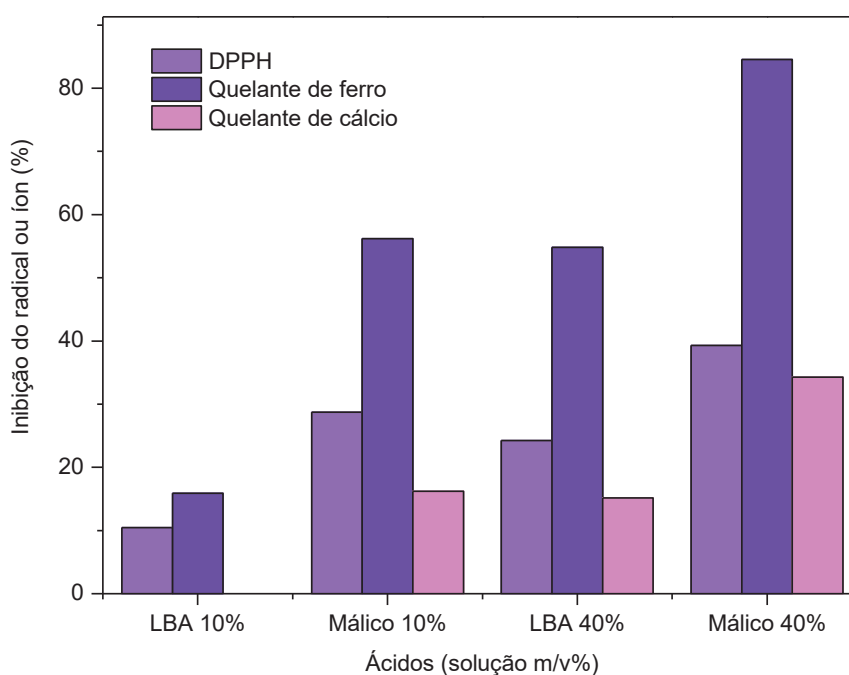
A atividade antibacteriana (APÊNDICE B – Tabela 2) é justificada pelos resultados de antioxidante, quelante e pH. O ácido málico não afetou as bactérias gram-positivas e gram-negativas de maneira diferente, as zonas de inibição foram semelhantes. A solução a 1% não apresentou zonas de inibição visíveis para nenhuma das bactérias testadas. Todas as zonas de

inibição obtidas por soluções de ácido málico acima de 10% diferiram significativamente do antibiótico (controle).

Cueva et al., (2010) e Mani-López; García; López-Malo, (2012) descreveram o mecanismo de ação dos ácidos orgânicos nas bactérias. Segundo eles, a atividade antioxidante impede a criação de espécies reativas de oxigênio e diminui o potencial redox do meio de cultura. Vale lembrar aqui que a atividade quelante também é uma propriedade antioxidante. Além disso, ácidos orgânicos como ácido málico e LBA se acumulam no citoplasma das células até níveis tóxicos, interferindo e perturbando as atividades essenciais, pois a célula requer o início de um transporte ativo de prótons para manter a homeostase. Este fato também indicaria uma vantagem do ácido málico, por ser uma molécula menor ($mm = 134,09 \text{ g/mol}$ contra $358,30 \text{ g/mol}$ do LBA). Além disso, o baixo pH das soluções reduz o pH interno das células bacterianas e restringe completamente o crescimento bacteriano.

Raybaudi-Massilia et al., (2009) evidenciaram que a solução de ácido málico a 2,5% com lactato de cálcio reduziu $5 \log \text{ CFU.g}^{-1}$ do crescimento de *E. coli* e *Listeria*. Isso indicou que é importante analisar o efeito da interação ácido málico/outras ingredientes dentro da matriz alimentar. Além disso, todos estes resultados sugerem a possibilidade de aplicar o ácido málico em biofilmes e embalagens ativas.

GRÁFICO 11 – COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E QUELANTE DAS SOLUÇÕES DE ÁCIDO MÁLICO E LBA, 10 E 40%.



FONTE: A autora (2020).

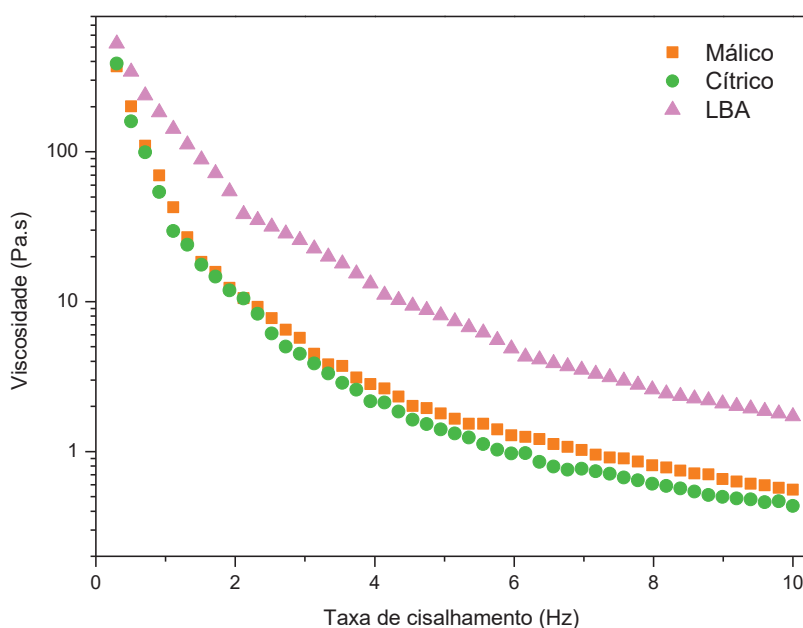
A correlação de Pearson nas análises para o ácido málico apontou valores $> 0,92$ para DPPH (%)/antibacteriano (mm), maiores 0,96 para quelante de ferro (%)/antibacteriano (mm) e valores inferiores porém maiores que 0,71 para quelante de cálcio (%)/ antibacteriano (mm). Os pares DPPH (%)/quelante de ferro (%) obteve 0,93 de correlação e DPPH (%)/quelante de cálcio% o valor de 0,89, corroborando a relação destas propriedades.

Análise: Formação de geis de pectina

LBA tem uma capacidade texturizante significativamente maior que os ácidos málico e cítrico, e assim confirmou duas capacidades ao mesmo tempo: de texturizante, e geleificante. Quanto a retenção de água, os dois ácidos obtiveram valores significativamente iguais ao do ácido cítrico em gel de pectina pouco consistente.

O gel de pectina acidificado com LBA apresentou maior tensão de cisalhamento no final de 300 segundos (Gráfico 12), indicando características mais elásticas e viscosas do que os géis de pectina de ácido málico e cítrico.

GRÁFICO 12 – PERFIL DE QUEBRA DOS GÉIS DE PECTINA COM LBA, ÁCIDO MÁLICO E CÍTRICO.



Viscosidade (Pa.s) apresentada em escala logarítmica. FONTE: A autora (2020).

Isso confirma a suposta propriedade estabilizante de géis de pectina atribuída ao ácido málico, melhor do que o ácido orgânico mais utilizado, e também confirma as propriedades de geleificação do LBA. Como o pH é o mesmo para os dois géis, ajustado em 3,4, provavelmente a capacidade de tamponamento atribuída ao ácido málico é responsável por essa pequena diferença de resistência com o ácido cítrico. Essa capacidade de tamponamento possivelmente

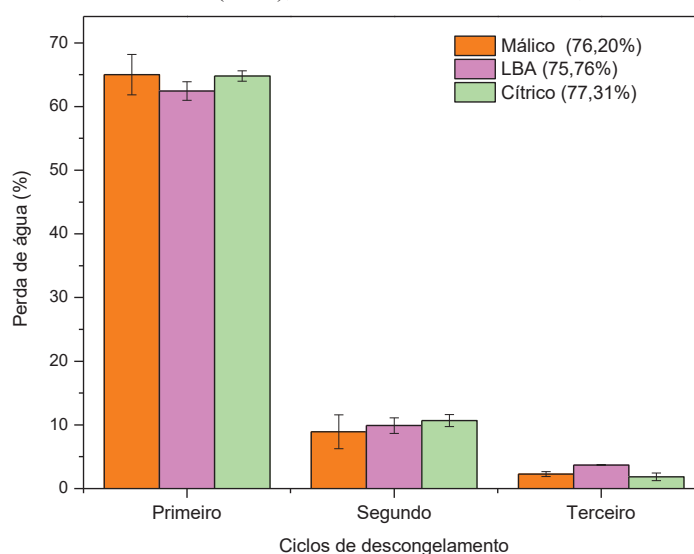
mantém o pH estável durante a adição de cloreto de cálcio, fornecendo uma ligação superior entre as estruturas químicas envolvidas. Já o LBA, com sua maior higroscopicidade e grupos ativos, auxiliou em manter a estrutura de pectina ligada durante a quebra realizada pela análise.

O gel de pectina com LBA apresentou uma estrutura de rede reticulada mais forte, mais difícil de girar o probe após 5 min. Apesar da maior tensão de cisalhamento inicial do gel de ácido cítrico (515 Pa.s contra 472 Pa.s de gel de ácido málico), após o tempo total, o mesmo parâmetro obteve gel de ácido cítrico = 0,43 Pa.s contra gel de ácido málico = 0,56 Pa.s. O gel de LBA terminou a análise com 1,73 Pa.s, mais do que o triplo do encontrado para o ácido málico. A tabela com as viscosidades dos géis está no APÊNDICE B – Tabela 3.

A sinérese dos géis durante três ciclos de congelamento e descongelamento não mostrou diferença significativa entre as amostras em nenhum dos ciclos. Isto corrobora o potencial de substituição do ácido cítrico pelo ácido málico e LBA nos processos alimentares, porém não destaca o LBA na retenção de água neste tipo de gel. O gel com LBA perdeu 1,55% menos de água que o gel de ácido cítrico e 0,44% menos que o de ácido málico.

A quantidade total de água perdida pode ser considerada alta (> 70%) (Gráfico 13), embora o objetivo aqui foi avaliar o comportamento dos ácidos, comparando-os. Outros géis de pectina, com componentes diferentes, podem gerar géis mais fortes, com perda de água inferior. Yoo et al., (2009) encontraram 38,6% de sinérese em géis de pectina da pectina metilesterase de laranja Valência (p-PME), utilizando apenas um ciclo de 72 horas de congelamento.

GRÁFICO 13 – SINÉRESE DE GÉIS DE PECTINA HM DURANTE TRÊS CICLOS DE DESCONGELAMENTO (72 H), COM ÁCIDOS MÁLICO, CÍTRICO E LBA.



ANOVA ($p < 0,05$) não encontrou diferença significativa entre as médias. FONTE: A autora (2020).

De acordo com Yoo et al., (2009) géis de pectina HM estão sendo empregados na estabilização da caseína em bebidas lácteas ácidas. Além disso, a pectina HM é conhecida por sua aplicação como agente geleificante para doces e geleias, produtos de confeitaria, recheios de padaria e estabilizador de sucos de frutas. Todas essas possibilidades têm grande potencial se combinadas com LBA e ácido málico.

5.3 Conclusões

O ácido málico possui propriedades quelantes e antioxidante superiores ao LBA, o que permite a formação de complexos estáveis com metais como ferro e cálcio. Em vista dessa propriedade, o ácido málico pode substituir o ácido cítrico no processamento e refino de óleos comestíveis, bem como na proteção contra a deterioração de alimentos e possível enriquecimento de alimentos.

O comportamento térmico e a alta solubilidade de ambos mostraram ainda as amplas possibilidades de aplicação na indústria de alimentos, pois a degradação começa após 140 °C para o ácido málico e em 190 °C para o LBA. A baixa higroscopicidade do ácido málico é uma característica desejável para produtos crocantes e produtos com baixa umidade (possivelmente mesmo na umidade <12% mencionada). A alta solubilidade e o baixo ponto de fusão permitem seu uso em bebidas e balas duras. A suposta propriedade de estabilização dos géis de pectina foi quantificada, similarmente útil para doces e geleias, afirmando um gel um pouco mais consistente com ácido málico. Um gel significativamente mais consistente destacou o LBA, com menor sinérese após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, do que com ácido cítrico.

Alimentos congelados, refrigerados e biofilmes são outras aplicações possíveis devido às propriedades encontradas e quantificadas. Um biofilme com propriedades antioxidantes, quelantes e antimicrobianas leves, contendo um acidificante com baixa higroscopicidade e características texturizantes, é altamente desejável. Bebidas, congelados e refrigerados também são uma possibilidade para o LBA, porém apenas em produtos onde absorção e retenção de umidade são desejáveis o LBA poderia ser aplicado, devido sua alta higroscopicidade.

Para aumentar a produção de ácido málico e LBA, talvez a obtenção atual deva ser apoiada pelo método biotecnológico, investindo na produção microbiana. Assim, uma concorrência justa poderia ser estabelecida com ácido cítrico.

Portanto, em resposta as hipóteses:

1. As propriedades do ácido málico como agente quelante de cálcio, texturizante e antioxidantes quando em solução são verdadeiras;
2. O LBA possui melhores propriedades texturizantes e de retenção de água (sendo que essa não foi significativamente maior) e o ácido málico é mais antioxidante e quelante nas mesmas concentrações. Nas propriedades comparadas com o ácido cítrico, LBA e málico mostram-se superiores para aplicação em alimentos.
3. Associando os possíveis usos, LBA e ácido málico podem substituir o ácido cítrico em determinados usos sim, como em óleos refinados, géis de pectina e doces consistentes. Contudo, a **higroscopicidade** deles deve ser analisada na hora da aplicação, pois essa foi a maior diferença encontrada entre eles, e com certeza direciona as possíveis aplicações como foi discutido.

CAPÍTULO 6 – Potencial prebiótico do suco de yacon com LBA e avaliação da vida útil do suco de yacon⁸

6.1 Introdução e hipóteses

De acordo com a FAO, (2008) prebióticos são “componentes não viáveis que conferem benefícios a saúde do consumidor associado, e age modulando a microbiota”. Em pesquisa, é possível encontrar estudo do potencial prebiótico de bebida de yacon com caju (DIONÍSIO et al., 2015), da raiz do yacon e da farinha (PEDRESCHI et al., 2003; SOUSA et al., 2015b). Devido as propriedades prebóticas já estabelecidas da raiz do yacon, e também atribuídas ao LBA mas sem muitos dados sobre (SAARELA et al., 2003), a combinação do suco de yacon conservado com LBA merece atenção. Sendo assim, o potencial prebiótico e estabilidade do suco de yacon, com LBA, ácido málico e sem ácido (controle), foram testado durante 180 dias de armazenamento refrigerado ($8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

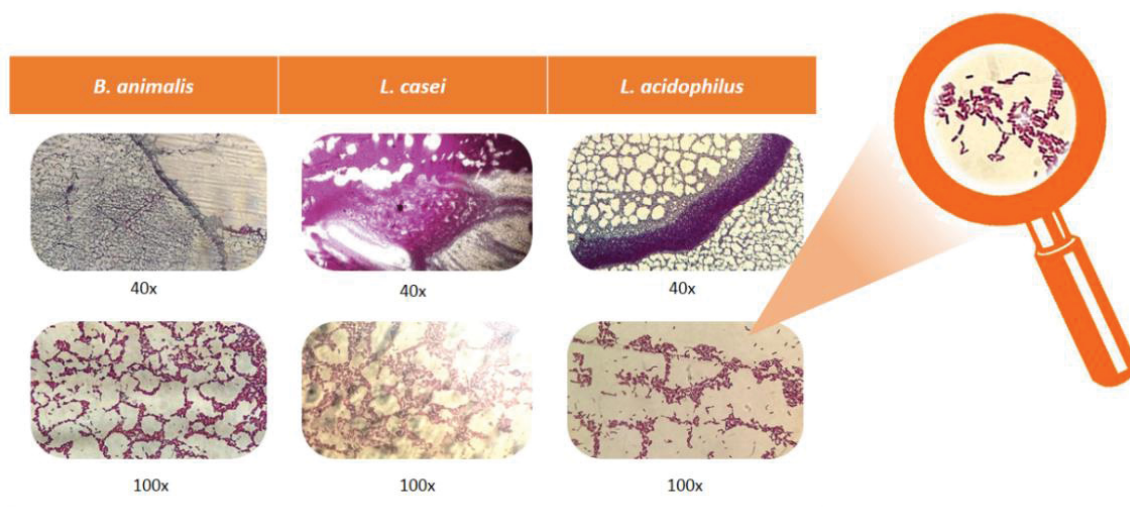
As hipóteses levantadas neste capítulo foram:

1. O suco de yacon consegue manter seu potencial prebiótico durante 180 dias de refrigeração;
2. O LBA aumenta o potencial prebiótico do suco de yacon;
3. O suco de yacon tem sua vida útil ampliada com a adição do LBA e do ácido málico.

O método que alcançou primeiro a ativação dos probióticos, com plaqueamento em ágar MRS, e diluição suficiente em água salina (0,85%) para crescimento de 10^8 UFC/mL, foi a adição direta deles liofilizados em caldo MRS e posterior incubação. A Fig. 12 mostra a confirmação das cepas como gram-positivas (coloração roxa), além da forma delas de bacilos, alongadas no caso do *L. acidophilus*, em ampliação 100x e zoom da foto.

⁸ Deste Capítulo 6, surgiu o artigo publicado na Revista **Food Bioscience**: MARQUES, C. et al. *Long-term storage of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice: Phytochemical profile, in vitro prebiotic potential and discriminant bioactive properties*, v. 41, 2021.

FIGURA 12 – MICROSCOPIA DA ANÁLISE DE COLORAÇÃO GRAM DOS PROBIÓTICOS UTILIZADOS.



FONTE: A autora (2020).

6.2 Abordagem multivariada para análise inicial

Para melhor entender o comportamento dos resultados como um todo, uma análise multivariada de Componentes Principais (PCA) foi aplicada. Primeiramente a MANOVA (*Main effects ANOVA*) apontou que ambas as variáveis, tempo e ácido, foram significativos para os resultados, como também a interação tempo vs. ácido ($p < 0,001$) e então a análise canônica apontou as variáveis discriminantes, que diferenciaram os sucos.

Funções discriminantes canônicas são combinações lineares das variáveis originais reunidas para definir aquelas variáveis que fazem a separação máxima entre os grupos (ARVANITOYANNIS; TSITSIKA; PANAGIOTAKI, 2005). A Tabela 10 representa a significância de todas as variáveis nas funções canônicas discriminantes, demonstrando a influência distinta que cada variável produziu no processo de classificação.

Com 99% da variação total, explicada pela Função 1, as melhores variáveis discriminantes que explicam as propriedades bioativas do suco de yacon durante o armazenamento refrigerado de longo prazo e o comportamento das amostras foram: Crescimento probiótico, seguido pelos parâmetros de cor, pH, fenólicos totais e quelante de Fe^{2+} ($p < 0,05$). As avaliações antioxidantes obtiveram o menor efeito discriminante ($p > 0,05$).

Esclarecendo os resultados, a alta validade dos resultados discriminantes foi corroborada por três pontos: A porcentagem cumulativa do primeiro Fator, os valores dos lambdas de Wilks baixos e autovalores altos. Quanto maior o autovalor, maior a quantidade de variância compartilhada na combinação linear de variáveis. Isso combinado com percentuais cumulativos

maiores que 90%, indicou o quão bem as variáveis foram diferenciadas nas amostras. Além disso, a ordem de discriminação mencionada acima, considerou que quanto mais próximo de zero o lambda de Wilks, mais a variável contribuiu para a função discriminante. Os valores p das análises discriminantes determinaram por último que a função correspondente explicava bem a associação ao grupo. Assim, a função discriminante foi considerada indispensável para classificar quais conjuntos de análises merecem mais atenção e devem ser discutidos em mais detalhes.

Tabela 10 – Resultados da MANOVA e variáveis discriminantes que acessam o comportamento do suco de yacon durante o armazenamento refrigerado de 120 dias.

Variáveis	MANOVA p-valores			Autovalores discriminantes	
	Tempo	Ácido	Interceptação	Lambda parcial	p-valor
Efeito	<0,001	<0,001	<0,001	-	-
DPPH	<0,001	<0,001	<0,001	0,770	0,980*
ABTS	<0,001	<0,001	<0,001	0,664	0,677*
Quelante de Ca	<0,001	<0,001	<0,001	0,534	0,104*
Quelante de Fe ²⁺	<0,001	<0,001	<0,001	0,411	0,002
Fenólicos totais	<0,001	<0,001	<0,001	0,682	0,763*
Fenólicos extraíveis	<0,001	<0,001	<0,001	0,248	<0,001
pH	0,006	<0,001	<0,001	0,018	<0,001
L*	0,001	<0,001	<0,001	0,006	<0,001
a*	0,398*	0,008	0,066*	0,014	<0,001
b*	0,307*	0,026	<0,001	0,038	<0,001
<i>B. animalis</i>	<0,001	0,013	<0,001	0,001	<0,001
<i>L. acidophilus</i>	<0,001	0,035	<0,001	0,001	<0,001
<i>L. lactis</i>	<0,001	0,839*	<0,001	0,003	<0,001
Resultados discriminantes e canônicos					
Fator	Auto-valor	R ² canônico	Lambda Wilks'	X ²	p-valor
1	4509,812	0,999	<0,001	3007,890	<0,001
2	1155,380	0,999	<0,001	2376,822	<0,001

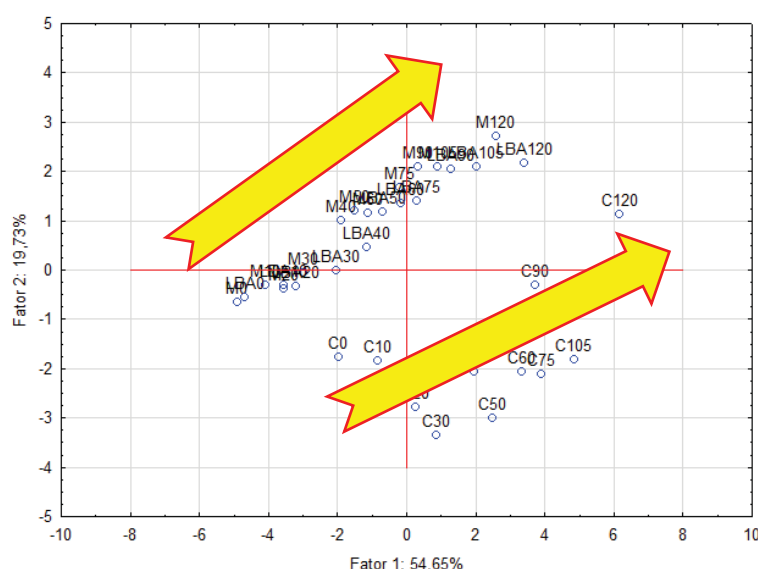
*Diferença não significativa (MANOVA; p<0.05). X² = qui-quadrado. FONTE: A autora (2020).

Para melhor visualização do comportamento das amostras, foi aplicado um método multivariado de Componentes Principais (PCA) (Gráfico 14). No Gráfico 14 ficou claro que o comportamento das amostras de suco de yacon inicialmente seguiu um comportamento semelhante, no mesmo quadrante, com visível proximidade das amostras com ácidos adicionados. Em seguida, a amostra controle, do dia 20 ao 105, adquiriu outro comportamento distinto das amostras com ácidos. Ao final, as amostras do dia 120 voltaram a apresentar

comportamento semelhante, no mesmo quadrante, embora ainda separando o controle das amostras com adição de ácido.

Em relação ao efeito do tempo de armazenamento, o PCA também exibiu amostras em quadrantes opostos (ver M0-M120 / LBA0-LBA120 e C0-C120), quando comparado aos tempos inicial (zero) e final (120), com 74,38% da variância cumulativa (F1x F2). Este comportamento possivelmente ocorreu devido aos maiores valores apresentados inicialmente pelas análises discriminantes (por exemplo, cor, crescimento probiótico, PET e quelante de Fe^{2+} , que diminuiram ao longo da vida de prateleira.

GRÁFICO 14 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS DE SUCO DE YACON DURANTE 120 DE ARMAZENAMENTO CONSIDERANDO TODAS AS ANÁLISES DISCUTIDAS.



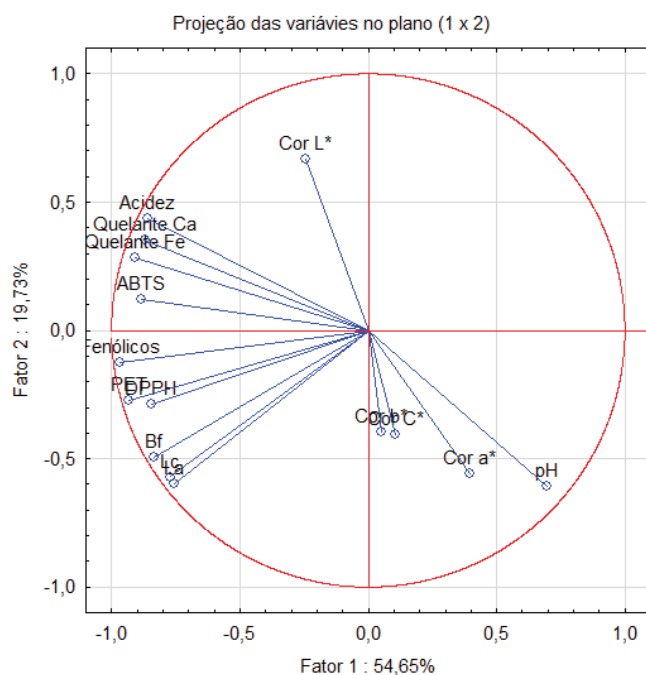
Sendo M=amostras de suco com ácido málico; C=Controle e LBA=sucos com LBA. FONTE: A autora (2020).

O comportamento distinto entre amostra controle e amostras com ácido, deve ter ocorrido devido à grande diferença de cor, além da queda acentuada na maioria dos parâmetros de controle no 20º dia de armazenamento, que serão apresentados a seguir. Ou seja, os ácidos conseguiram manter os parâmetros analisados, principalmente os compostos bioativos, com valores maiores e mais estáveis por um período maior de tempo. Quanto à representatividade das análises (Gráfico 15) em determinados momentos do armazenamento, o pH e os parâmetros de cor a^* , b^* , ficaram positivamente correlacionados com os dados da amostra de controle. As demais análises, parâmetro de cor L^* , e microbiológica, representaram melhor as amostras com ácidos, provavelmente por terem obtido valores médios maiores nestes parâmetros.

No Gráfico 15 foi possível observar que as análises representaram melhor as amostras no início até o dia 60. Portanto, considerando as análises físico-químicas e microbiológicas em

conjunto, o 60º dia pode ser considerado um limite, onde os dados passaram a não demonstrar um padrão de comportamento para as amostras de suco de yacon. Devido a esse comportamento, as análises consideradas discriminativas ($p < 0,05$) serão discutidas individualmente a seguir, mostrando cada contribuição e também confirmando o papel fundamental dos ácidos e do tempo de armazenamento no comportamento do suco de yacon.

GRÁFICO 15 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS SOBRE A REPRESENTATIVIDADE DAS ANÁLISES DISCUTIDAS.



FONTE: A autora (2020).

6.3 Análises microbiológicas de segurança alimentar

O que limitou a análise dos sucos, foram os resultados de Bolores e Leveduras que ultrapassaram o limite aceitável pela legislação (10^3 UFC/mL para sucos adicionados de conservantes e refrigerados), no dia 105 de análise, para as amostras com ácidos, e dia 60 para amostra controle. Portanto as análises foram finalizadas no dia 120 de armazenamento refrigerado. Para todos os dias analisados, não houve crescimento para *E. coli*, coliformes a 45 °C e total ausência/25 mL para *Salmonella spp.* Na Tabela 11 encontram-se os resultados microbiológicos dos sucos de yacon.

Tabela 11 – Resultados das análises microbiológicas dos sucos de yacon, com e sem ácidos adicionados, durante 120 dias de armazenamento refrigerado

Análises	Suco de yacon com Ácido málico	Suco de yacon Controle	Suco de yacon com LBA
<i>E. coli</i> , coliformes a 45 °C e <i>Salmonella spp.</i>	Ausência de crescimento microbiológico até dia 120 de armazenamento	Ausência de crescimento microbiológico até dia 120 de armazenamento	Ausência de crescimento microbiológico até dia 120 de armazenamento
Bolores e leveduras Dia 60*	7,30 x 10 ² UFC/mL ± 10,99	1,43 x 10 ³ UFC/mL ± 22,23	4,81 x 10 ² UFC/mL ± 4,83
Bolores e leveduras Dia 75	1,55 x 10 ² UFC/mL ± 20,50	1,15 x 10 ³ UFC/mL ± 120,20	8,50 x 10 UFC/mL ± 21,21
Bolores e leveduras Dia 90	1,20 x 10 ² UFC/mL ± 11,31	1,05 x 10 ³ UFC/mL ± 13,43	1,00 x 10 UFC/mL ± 1,10
Bolores e leveduras Dia 105	6,00 x 10 ² UFC/mL ± 56,57	8,10 x 10 ³ UFC/mL ± 10,34	2,30 x 10 ² UFC/mL ± 24,04
Bolores e leveduras Dia 120	1,05 x 10 ³ UFC/mL ± 13,43	1,25 x 10 ⁵ UFC/mL ± 32,48	1,65 x 10 ³ UFC/mL ± 49,50

* Nenhuma contagem de Bolores e Leveduras foi encontrada antes do dia 60. FONTE: A autora (2020).

Portanto, o limitante do suco de yacon pasteurizado, e refrigerado, é o crescimento de Bolores e Leveduras, que ganham destaque com o aumento do pH e diminuição da acidez, discutidos a seguir.

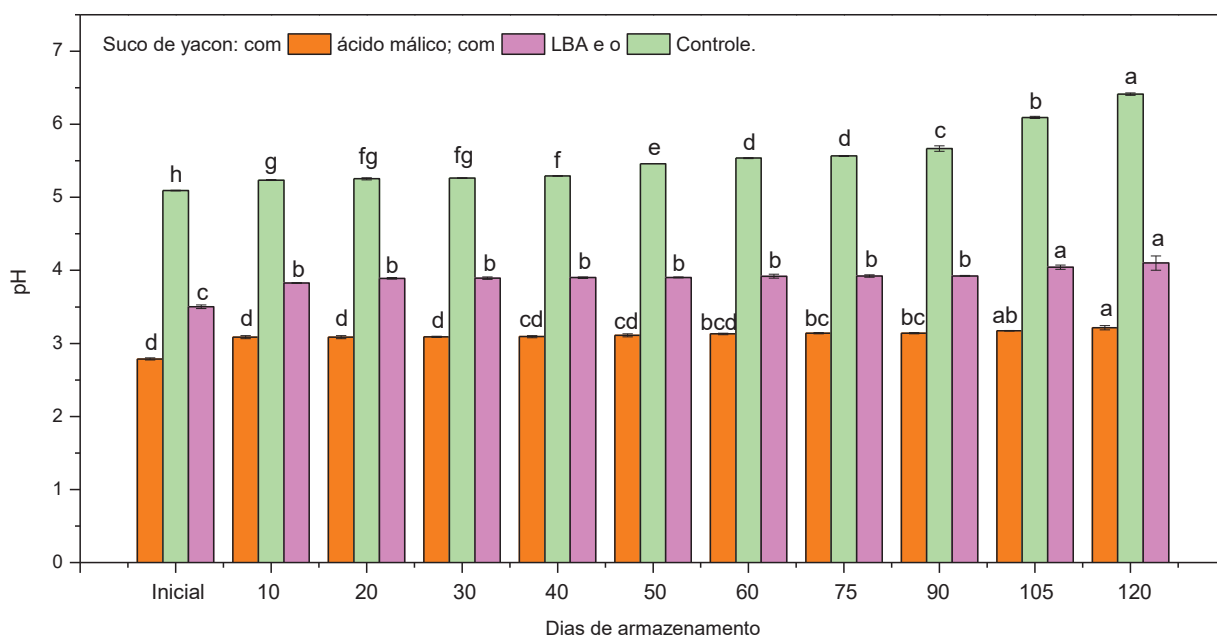
6.4 Influência do armazenamento e dos ácidos nos parâmetros físico-químicos

Dois fatos se destacaram nos dados de pH e acidez dos sucos de yacon refrigerados. O primeiro, sobre a notável capacidade dos ácidos málico e LBA de manter o pH do suco, em uma estreita faixa de mudança durante o período de 120 dias, em contraste com o suco Controle. Segundo, a capacidade do ácido málico em aumentar a acidez titulável do suco de yacon no mesmo período. Os Gráficos 16 e 17 ilustram o perfil de mudança de pH e acidez do suco de yacon durante o tempo de armazenamento analisado.

Como já mencionado no item 4.2.3, o pH considerado de segurança é 4,5, e dentro disso ambos os ácidos testados foram capazes de manter este limite durante 120 dias. Considerando um limite de segurança mais baixo, de pH 4,0, o ácido málico manteve o pH em até 3,22 durante 120 dias, já o suco de yacon com LBA atingiu pH 4,04 no dia 105. Mesmo assim, os ácidos mostraram efetividade em diminuir o pH do suco de yacon de 5,09 para valores menores que

4,0. Além disso, o LBA permitiu um aumento significativo inicial do pH do suco, e do dia 10 ao dia 90, manteve os valores estáveis. O ácido málico foi capaz de manter o pH sem diferença significativa, do tempo Inicial até o dia 60 de análises. Estes valores de pH foram corroborados por Lago e Noreña (2014), que indicaram uma redução de pH no suco de yacon, de 6,14 para 2,93 com a adição de 1% de ácido cítrico.

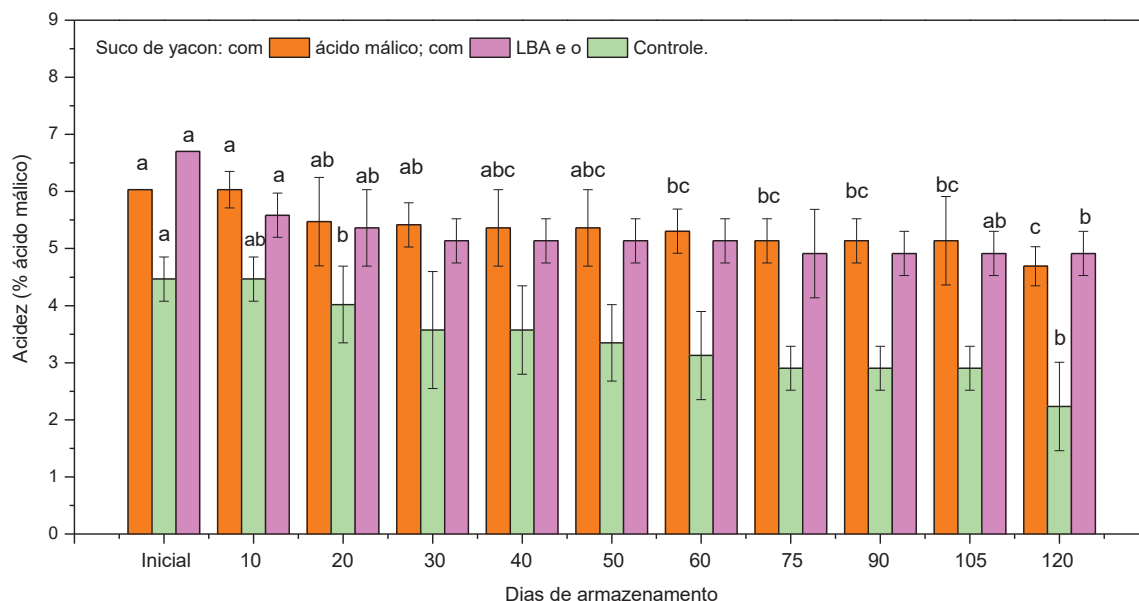
GRÁFICO 16 – COMPORTAMENTO DO PH DURANTE O ARMAZENAMENTO DO SUCO DE YACON.



FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada por letras diferentes nas colunas de mesma cor (ANOVA; Tukey $p < 0,05$).

Como esperado, a acidez titulável das amostras de suco de yacon com 1% de ácido adicionado foram maiores que a da amostra Controle. O perfil encontrado foi uma acidez maior inicialmente, e posterior diminuição dos valores, sendo que o LBA manteve a acidez sem diminuição significativa por 105 dias de armazenamento refrigerado e o ácido málico, por 50 dias. Com os valores de pK_a próximos, estes dois ácidos mantiveram a acidez do suco em valores parecidos também, entre 4,5 e 6,0. A legislação (BRASIL, 2018) não promove padrões de acidez gerais para sucos, sendo que cada fruto recebe uma classificação, porém, não existe um valor máximo de acidez requerido para nenhum suco, só valores mínimos, que vão de 0,05 a 10% (expresso em ácido cítrico). Portanto, os valores encontrados aqui estariam de acordo com a legislação Brasileira, já que os equivalente-gramas dos ácidos cítrico (64) e málico (67) são próximos.

GRÁFICO 17 – COMPORTAMENTO DA ACIDEZ, EXPRESSA EM % DE ÁCIDO MÁLICO, DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.



FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada por letras diferentes nas colunas de mesma cor (ANOVA; Tukey $p < 0,05$). Ausência de letras demonstra que não houve diferença significativas desde a última letra mencionada, analisando da esquerda para a direita a progressão do armazenamento.

6.5 Influência do armazenamento e dos ácidos na cor dos sucos

A cor dos sucos avaliados, é o parâmetro visível onde é mais perceptível a diferença entre as amostras e a importância da adição de ácidos, na preservação da cor do suco de yacon. A Fig. 13 mostra esta diferença, considerando fotos tiradas dos sucos em cada dia de análise. Sendo poucos os estudos do suco de yacon não misturado, não existem dados ou bibliografia que justifique ou discuta a cor verde do suco de yacon. A explicação pode conter três fatores: existência de clorofila, taninos, da parte mais interna da casca que foi processada junto com o suco, e atividade das PPOs.

De acordo com Butler e Rivera (2004), a parte mais interna da casca da raiz do yacon contém uma variedade de compostos taninos e outros fenólicos, dentre eles: Os ácidos clorogênico, cafeico, oxálico, ferrúlico, gálico além da quercitina. Adicionalmente, taninos também foram encontrados na farinha da polpa da raiz do yacon (PEREIRA et al., 2016), o que demonstra a presença destes compostos não só na casca. Taninos são conhecidos por fornecer cores de amarelo a marrom-escuro, e também por serem relativamente estáveis entre pH 3 e 7. Já a clorofila, entre pH 4 e 6, na presença de metais (como o Mg^{2+} existente na raiz do yacon), tende a mudar a cor para o pigmento verde-castanho chamado de feofitina (DAMODARAN;

PARKIN; FENNEMA, 2007). Lembrando também, que o suco Controle tem alta atividade de PPOs, portanto, mesmo que em velocidade baixa, devido a refrigeração, os taninos e compostos fenólicos do suco estão sendo metabolizados como substratos destas enzimas, produzindo outros compostos de cor marrom.

FIGURA 13 – COR DOS SUCOS DE YACON, ADICIONADO OU NÃO DE ÁCIDOS, DURANTE 120 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.

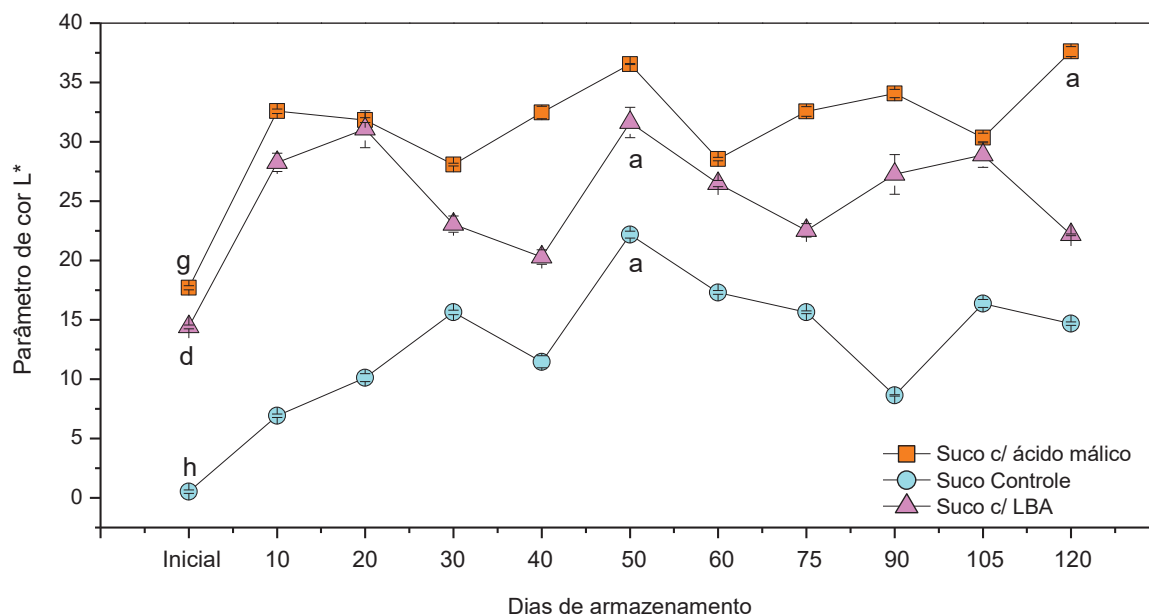
Suco	Inicial	Dia 10	Dia 20	Dia 30	Dia 40	Dia 50	Dia 60	Dia 75	Dia 90	Dia 105	Dia 120
Málico											
Controle											
LBA											

FONTE: A autora (2020).

Nos sucos tratados com os ácidos málico e LBA, ficou evidente que o pH influenciou, tanto o escurecimento enzimático, quanto a mudança de pigmentos como taninos e clorofila ali presentes. A cor amarelada, inicial, permanece até o final dos 120 dias de armazenamento, com escurecimento perceptível. No Brasil, as raízes tuberosas de yacon geralmente apresentam cores amarelo claro ou amarelo intenso, sendo os carotenóides, os pigmentos responsáveis pela coloração. Carotenos e retinol são compostos já confirmados na composição das raízes do yacon (LACHMAN; FERNÁNDEZ; ORSÁK, 2003; QUINTEROS, 2000). Ao mesmo tempo, são compostos que alcançam baixos índices de perda em sucos refrigerados e pasteurizados, como mostrou Cortés et al., (2006) estudando o suco de laranja pasteurizado, que atingiu 12% de perda de carotenoides em 7 semanas de armazenamento (10 °C).

O comportamento dos parâmetros de cor demonstrou a efetividade dos ácidos, málico e lactobiônico, em diminuir a amplitude de mudança dos parâmetros de cor. O parâmetro L*, que indica a luminosidade, que vai de preto (zero) até branco (100), estabeleceu o suco Controle como o mais escuro (Gráfico 18), e este fato foi percebido com clareza nas fotos das amostras. A amplitude da diferença significativa foi maior também na amostra de suco Controle, para todos os parâmetros de cor avaliados, o que demonstrou a falta de estabilidade da cor do suco de yacon sem tratamento ácido.

GRÁFICO 18 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR L* (LUMINOSIDADE; BRANCO-PRETO) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.

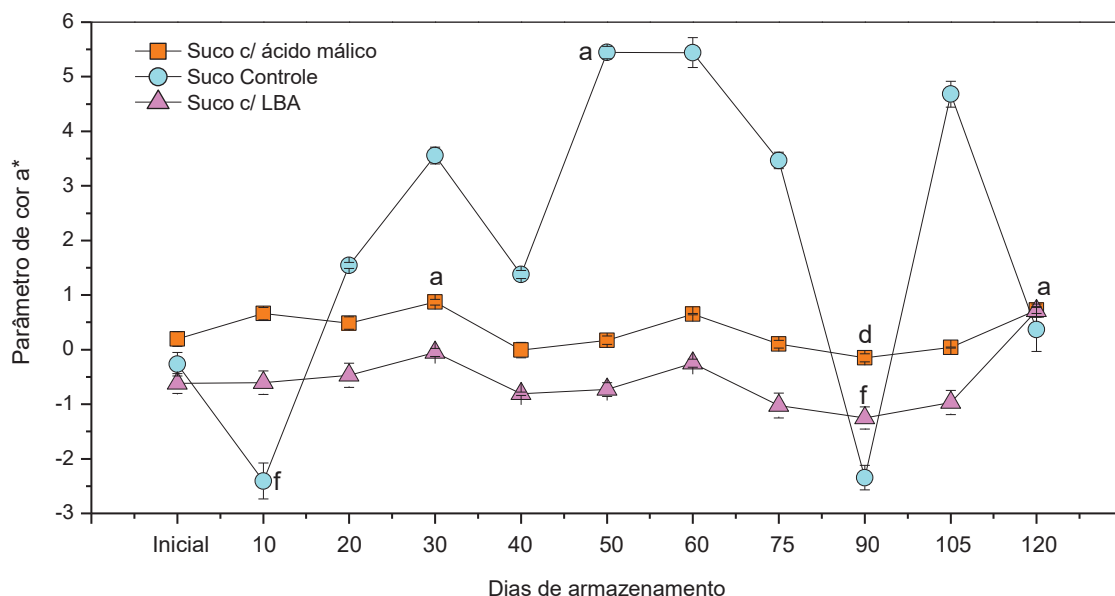


FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada somente na maior e menor média, para enfatizar a amplitude das mudanças sem poluir o gráfico de informação (ANOVA; Tukey $p < 0,05$).

Os Gráficos (18, 19, 20 e 21) trazem apenas indicadas a maior e a menor média, com a amplitude das diferenças apontadas pelas letras minúsculas no respectivo valor. Isso porque, o desvio padrão encontrado, e também representado graficamente, foi baixo, e as amplitudes de diferença encontradas (letras do teste Tukey; $p < 0,05$) significam menos que o perfil da mudança de cor encontrado. Como por exemplo, o comportamento dos sucos com ácido málico e LBA quanto ao parâmetro de cor a^* . Evidentemente os ácidos mantiveram os valores de a^* estáveis, entre -1,0 e 0,5, durante 120 dias, mesmo que a amplitude das médias do suco com LBA tenha sido grande (a-f).

A forte cor das amostras de suco de yacon Controle, dos dias 10 e 90 de armazenamento, também ficaram assinalados pelos valores negativos de a^* , que indicam a cor verde. As outras amostras, que apresentaram coloração marrom alaranjado foram assinaladas pelo parâmetro a^* positivo, que indica a cor vermelha.

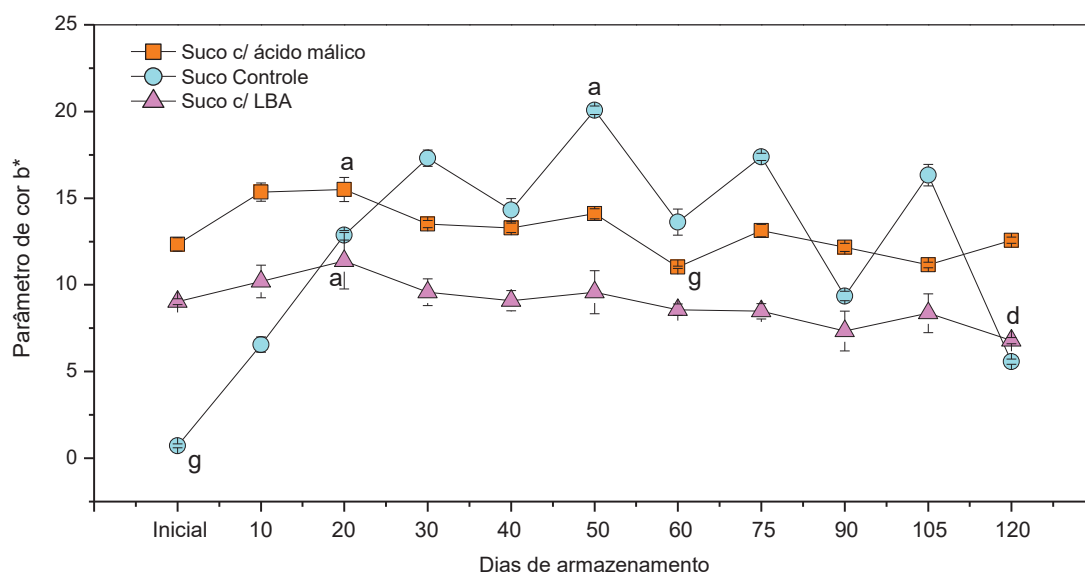
GRÁFICO 19 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR a^* (VERDE-VERMELHO) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.



FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada somente na maior e menor média, para enfatizar a amplitude das mudanças sem poluir o gráfico de informação (ANOVA; Tukey $p < 0,05$).

A semelhança de comportamento, dos sucos com tratamento ácido, quanto ao parâmetro a^* , se repetiram para os parâmetros b^* e C^* . Os valores positivos de b^* (Gráfico 20) reforçaram a coloração amarela encontrada para ambas as amostras.

GRÁFICO 20 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR b^* (AZUL-AMARELO) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.

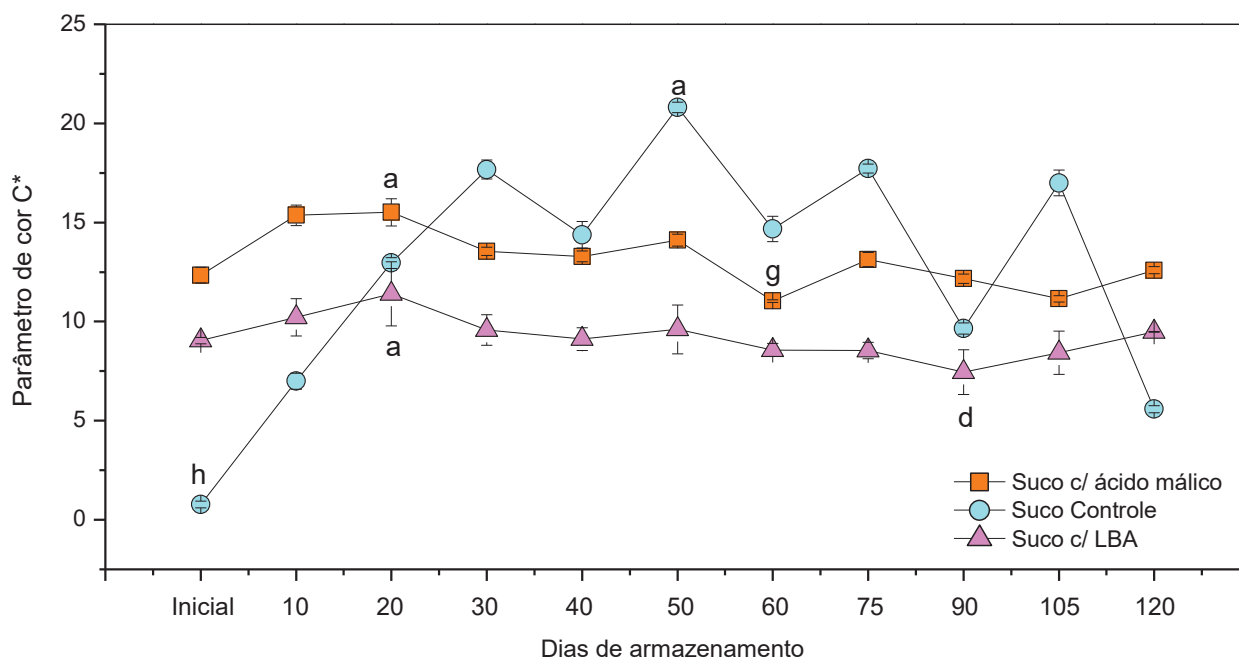


FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada somente na maior e menor média, para enfatizar a amplitude das mudanças sem poluir o gráfico de informação (ANOVA; Tukey $p < 0,05$).

Sobre a intensidade de cor, representada pelo parâmetro C^* (Gráfico 21), o LBA manteve a intensidade mais baixa, porém com um perfil estável e com comportamento semelhante ao do ácido málico. Para os parâmetros b^* e C^* , a amplitude de diferença para o LBA foi a-d, e para o ácido málico a-g. Visivelmente, não houve muita diferença entre as amostras adicionadas de ácido, porém a diferença nos valores ainda pode ser avaliada sensorialmente, pois maiores valores de saturação C^* estão relacionados com maior aceitação sensorial de produtos alimentícios. Isso ocorre, pois quanto mais baixo os valores de cromaticidade C^* , mais cinza a amostra é considerada, em outras palavras, menos colorida, e alimentos coloridos são cognitivamente relacionados com saúde, e com maiores porções para consumo (KÖNIG; RENNER, 2018).

Portanto, os ácidos utilizados permitiram o escurecimento do suco, porém auxiliaram inicialmente e mantiveram a cor amarela, com perfil mais estável e sem comparação às cores verde/marrom da amostra Controle. A adição dos ácidos málico e LBA no suco de yacon foram imprecindíveis para manutenção de cor durante 120 dias de armazenamento refrigerado.

GRÁFICO 21 – COMPORTAMENTO DO PARÂMETRO DE COR C^* (INTENSIDADE DE COR) DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO.



FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada somente na maior e menor média, para enfatizar a amplitude das mudanças sem poluir o gráfico de informação (ANOVA; Tukey $p < 0,05$).

6.6 Influência do armazenamento no conteúdo fenólico

A Tabela 12 mostra os resultados dos compostos fenólicos e polifenóis extraíveis totais, das amostras de suco de yacon durante os 120 de armazenamento refrigerado. Foi possível notar o decréscimo de ambos os parâmetros ao longo do armazenamento, com porcentagens de redução que foram de 36 a 48%. O conteúdo de polifenóis extraíveis totais (PET), que indica a quantidade de compostos bioativos fenólicos, disponíveis para agir como antioxidante no produto (DIONISIO et al., 2017), também apontaram valores significativamente maiores para as amostras de suco adicionadas de ácido, no final dos 120 dias, indicando que uma menor quantidade de compostos fenólicos foi comprometida pela oxidação do suco ao longo do tempo. O ácido málico apresentou a maior capacidade de retenção de compostos fenólicos, seguido do LBA, com diferenças de 6,8% e 10% da amostra Controle, respectivamente.

A manutenção de compostos fenólicos durante o período de armazenamento refrigerado é essencial, pois são estes compostos que exercem a atividade antioxidante e quelante, no produto e no organismo humano. Enquanto os ácidos adicionados, LBA e málico, agirão como antioxidantes do produto, no lugar dos fenólicos presentes, além de diminuir o pH do meio.

Tabela 12 – Resultados das análises de compostos fenólicos e polifenóis extraíveis totais, dos sucos de yacon, com e sem ácidos adicionados, durante 120 dias de armazenamento refrigerado.

Dias	Suco c/ ácido málico		Suco Controle		Suco c/ LBA	
	PET*	Fenólicos**	PET	Fenólicos	PET	Fenólicos
Inicial	353,30 ^a ±40,56	2887,89 ^a ±106,97	321,41 ^a ±53,03	2443,44 ^a ±92,05	345,69 ^a ±63,93	2631,22 ^a ±70,49
10	336,06 ^{ab} ±65,84	2612,89 ^{ab} ±146,46	316,24 ^a ±77,15	2250,67 ^{ab} ±91,17	321,41 ^{ab} ±70,21	2464,56 ^a ±141,52
20	324,14 ^{ab} ±33,41	2524,56 ^{ab} ±201,97	293,82 ^{ab} ±59,09	2215,67 ^{abc} ±134,35	298,42 ^{abc} ±59,68	2447,33 ^a ±144,19
30	314,80 ^{ab} ±72,49	2510,11 ^{abc} ±84,36	272,27 ^b ±17,85	2191,78 ^{abc} ±78,31	286,49 ^{abc} ±44,24	2410,11 ^a ±119,33
40	281,18 ^{abc} ±20,85	2473,44 ^{abc} ±110,56	229,31 ^c ±14,44	2001,22 ^{abc} ±134,52	254,17 ^{bcd} ±19,33	2181,22 ^{ab} ±97,81
50	271,98 ^{bcd} ±47,22	2404,56 ^{abc} ±161,56	221,98 ^{cd} ±13,40	1985,67 ^{abc} ±86,43	248,42 ^{bcd} ±14,67	2166,78 ^{ab} ±225,40
60	271,70 ^{bcd} ±19,03	2352,33 ^{abc} ±121,61	197,56 ^{cde} ±11,77	1826,78 ^{bcd} ±147,52	247,99 ^{bcd} ±15,89	2163,44 ^{ab} ±98,53
75	236,21 ^{cd} ±20,46	2255,11 ^{abc} ±183,49	188,07 ^{de} ±7,48	1703,44 ^{bcd} ±136,35	232,90 ^{cd} ±18,81	2119,56 ^{ab} ±210,75
90	239,80 ^{cd} ±15,69	2094,56 ^{bc} ±159,87	174,28 ^e ±10,69	1623,44 ^{bcd} ±216,03	191,24 ^d ±21,66	2024,56 ^{ab} ±122,20
105	202,73 ^d ±10,66	2062,33 ^{bc} ±95,19	166,95 ^e ±3,84	1660,11 ^{cd} ±120,47	182,76 ^d ±15,46	1581,78 ^b ±193,35
120	199,28 ^{A,d} ±11,55	1828,44 ^c ±203,32	166,09 ^{B,c} ±9,42	1302,89 ^d ±153,92	182,61 ^{A,d} ±7,56	1621,22 ^b ±153,37
%***	43,59%	36,69%	48,32%	46,68%	47,17%	39,88%

*PET = polifenóis extraíveis totais (mg GAE.100g⁻¹); **Fenólicos expressos em µM GAE.L⁻¹.

***Porcentagem de redução ao longo dos 120 dias.

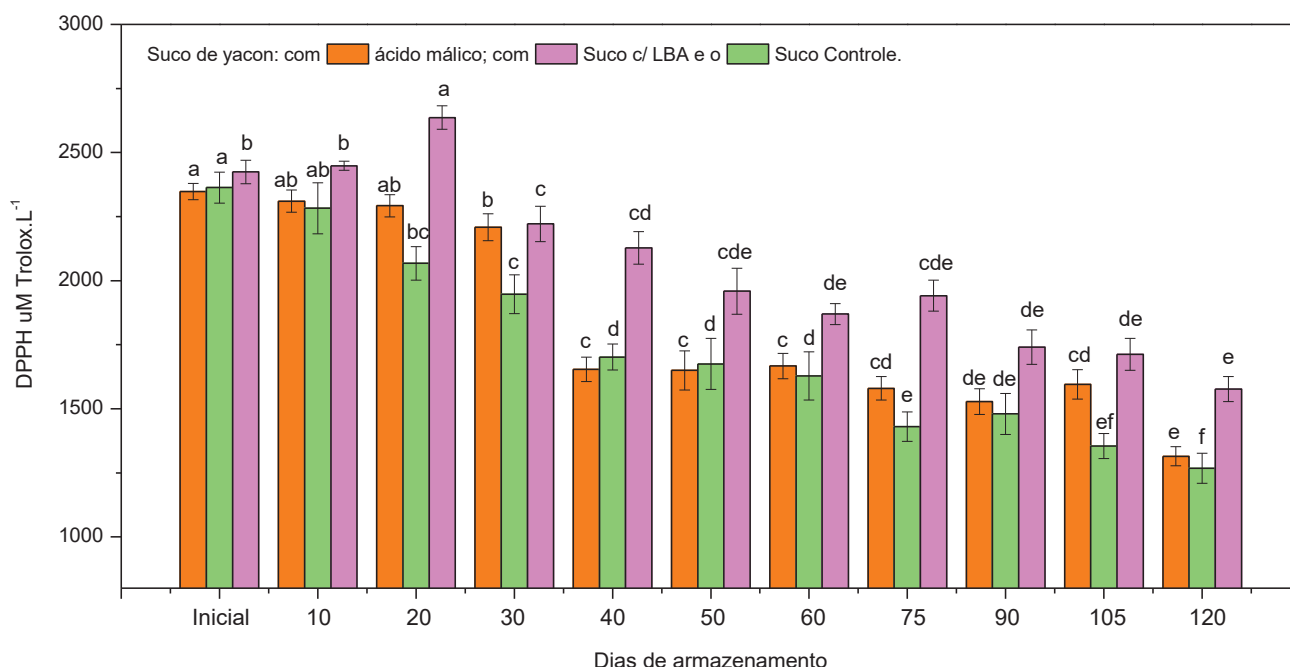
FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada na mesma coluna com letras minúsculas, e entre os tratamentos finais (PET, 120), com letra maiúscula (ANOVA; Tukey p<0,05).

6.7 Influência do armazenamento e dos ácidos nas atividades quelante e antioxidante

Os Gráficos 22 e 23 representam as atividades antioxidantes encontradas para o suco de yacon, com e sem ácidos adicionados, durante os 120 dias de armazenamento refrigerado. Enquanto o suco Controle perdeu mais de 50% da atividade antioxidante, analisada por ambos os métodos, o ácido málico permitiu a redução de 38-44% da atividade antioxidante e o LBA de 34-39%. Portanto, o LBA conseguiu manter de forma mais eficaz o potencial antioxidante dos sucos por 120 dias, mesmo que a redução tenha sido estatisticamente significativa.

Analisando os PET e fenólicos do suco com LBA e ácido málico, o suco com ácido málico deveria ter apresentado menor redução da atividade antioxidante já que obteve menor redução de compostos fenólicos. Isso indica, novamente, um potencial antioxidante do LBA, dentro do suco, como já foi discutido nos Capítulos 4 e 5, com indicadores de enriquecimento do produto. A metodologia do radical ABTS demonstrou uma maior diferença entre os sucos Controle e com ácidos. Além disso, evidenciou uma queda brusca já do no décimo dia de análise, com posterior estabilidade.

GRÁFICO 22 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR RADICAL DPPH DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.

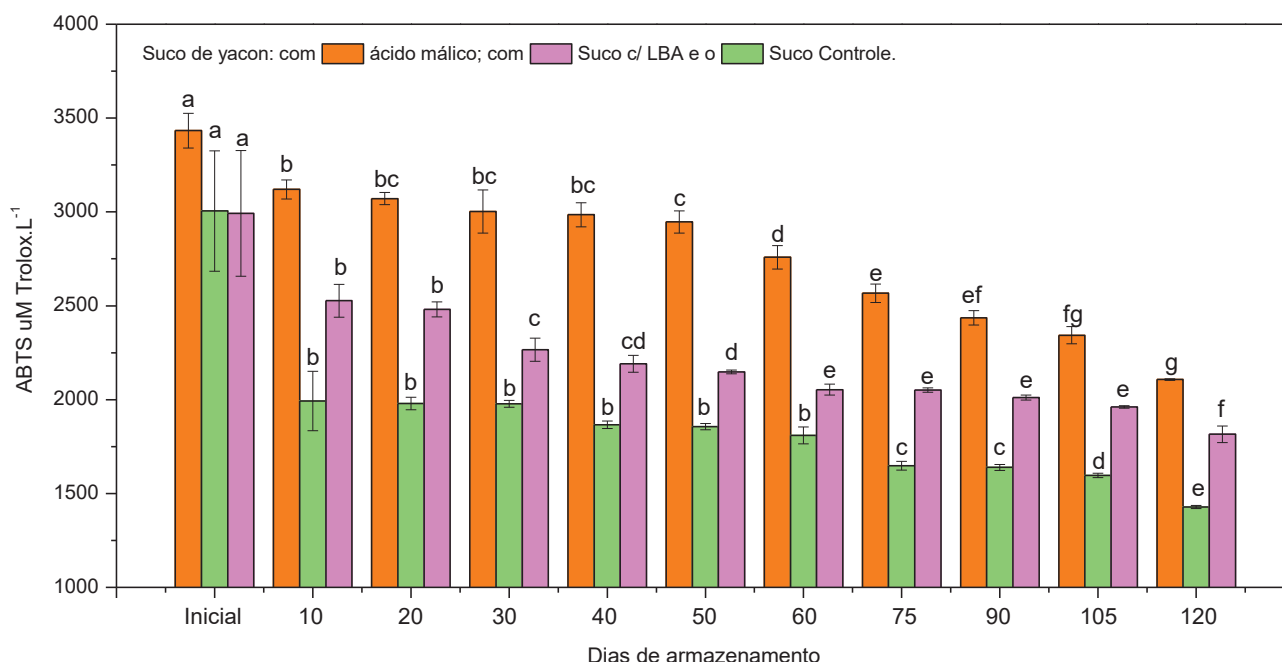


FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada por letras minúsculas nas barras de mesma cor (ANOVA; Tukey $p < 0,05$). A redução de atividade antioxidante neste método totalizou: 44,00 (Suco c/ ácido málico), 50,36% (Suco Controle) e 34,94% (Suco c/ LBA).

Ambos os métodos foram utilizados para acessar a atividade antioxidante, devido as vantagens e desvantagens de cada um. O radical DPPH é mais sensível a mudanças de pH e pHs baixos (SHALABY, 2013), e pode ter superestimado a atividade antioxidante da amostra Controle, que apresentou maior mudança de pH durante o armazenamento, e subestimado a atividade antioxidante dos sucos com ácidos. Já o radical ABTS é conhecido por sua boa determinação em meios com compostos antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos (APAK et al., 2016), e tem o radical mais estável aos diferentes valores de pH. Ainda segundo Apak e co-autores (2016), ambas metodologias podem subestimar valores de capacidade antioxidante pelo mecanismo de impedimento estérico, já que possuem moléculas grandes. Isso também pode ter subestimado o valor das amostras com LBA, já que este ácido possui uma estrutura mais complexa que o málico, e conta até mesmo com um anel (cíclico) em sua estrutura (Fig. 1).

Quanto aos valores de antioxidante encontrados, os dados são similares aos levantados no delineamento do Capítulo 4, entre 1500 e 3000 $\mu\text{M Trolox.L}^{-1}$. Não foram encontrados dados na literatura para comparação do suco puro (não-misturado) de yacon refrigerado, e as atividades antioxidantes encontradas foram substanciais.

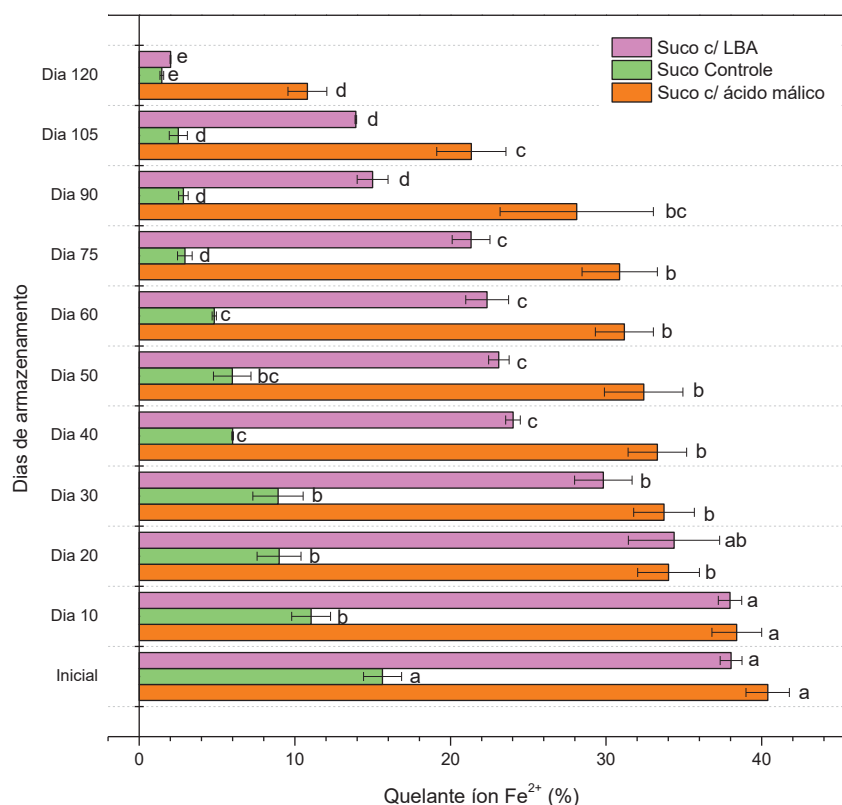
GRÁFICO 23 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR RADICAL ABTS DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.



FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada por letras minúsculas nas barras de mesma cor (ANOVA; Tukey $p < 0,05$). A redução de atividade antioxidante neste método totalizou: 38,61 (Suco c/ ácido málico), 52,47% (Suco Controle) e 39,34% (Suco c/ LBA).

Sobre a capacidade quelante, de ferro e cálcio, importante parâmetro que indica potencial para enriquecimento destes produtos, com metais essenciais ao metabolismo humano, estão representados nos Gráficos 24 e 25, respectivamente. O ácido málico foi capaz de manter de forma mais efetiva a capacidade quelante de íons Fe^{2+} , durante os 120 dias de armazenamento, quando comparado aos outros dois tratamentos. No período analisado, 73% da atividade quelante de ferro foi reduzida na amostra com ácido málico, 95% na amostra com LBA e 91% no Controle. Contudo, os valores da amostra Controle são visivelmente inferiores até o dia 105. Entre os dias 105 e 120 a amostra com LBA também apresentou brusca redução deste parâmetro, com valores equiparáveis ao do Controle. O LBA foi efetivo, com valores similares do ácido málico, até o dia 30 de armazenamento, com posterior redução significativa. Já o ácido málico manteve uma estabilidade na capacidade quelante de ferro, desde o dia 20 até o dia 90 de armazenamento, e isso pode ter ocorrido devido ao pH mais baixo que a amostra de LBA, mantendo uma maior quantidade de íons protonados no meio sob análise, o suco de yacon.

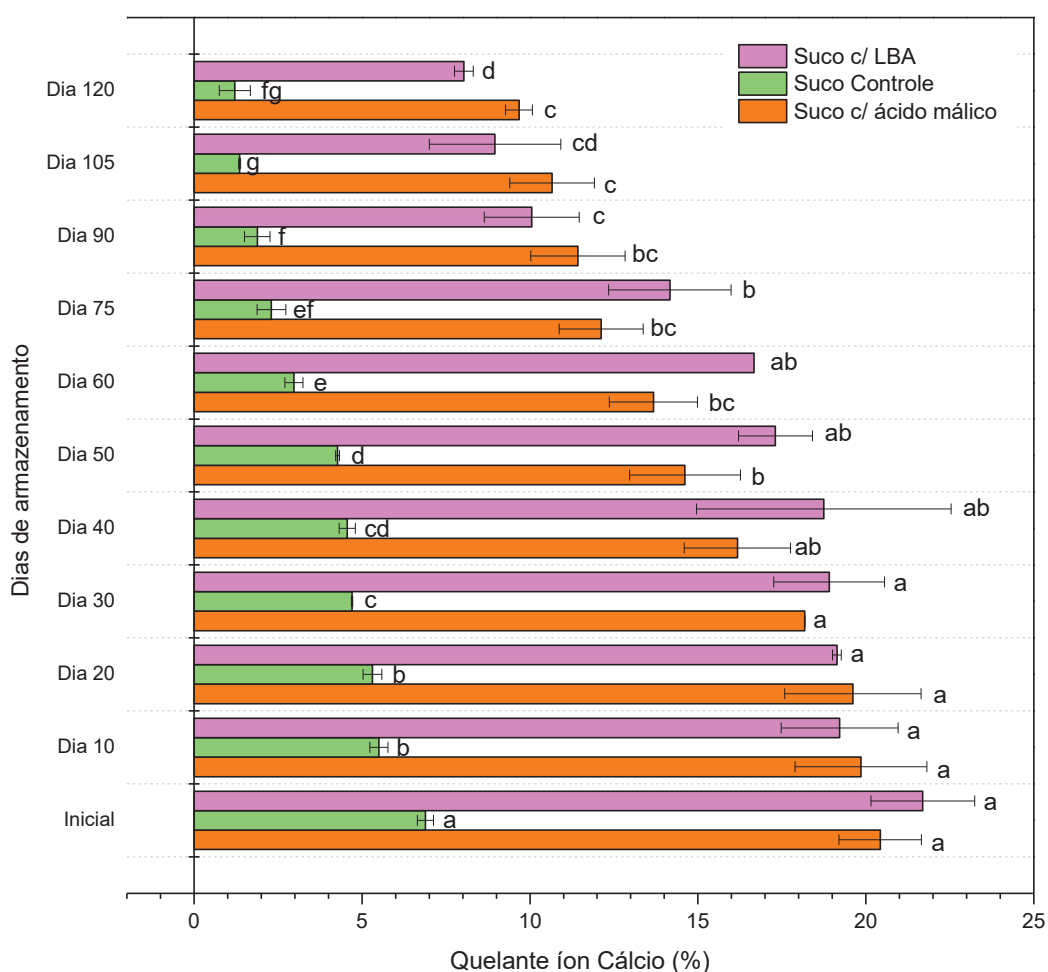
GRÁFICO 24 – ATIVIDADE QUELANTE DE ÍONS FERRO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.



FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada por letras minúsculas nas barras de mesma cor (ANOVA; Tukey $p < 0,05$). A redução de atividade quelante de ferro totalizou: 73,23 (Suco c/ ácido málico), 90,70% (Suco Controle) e 94,71% (Suco c/ LBA).

Estes dados significam que o LBA e o ácido málico, até o dia 30, conseguiriam quelar de 30-40% dos íons ferro, já presentes ou adicionados ao suco de yacon refrigerado, auxiliando na manutenção deles no organismo até sua absorção, principalmente no intestino. Com relação aos íons de cálcio (Gráfico 25), foi possível notar o destaque da atividade do LBA, até o dia 75 de análise, e depois o ácido málico consegue manter mais a estabilidade desse parâmetro. Porém os dois ácidos mantiveram os valores de quelação de íons cálcio (%) significativamente e visivelmente maiores que a amostra Controle durante os 120 dias.

GRÁFICO 25 – ATIVIDADE QUELANTE DE ÍONS CÁLCIO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO.



FONTE: A autora (2020). Diferença significativa entre médias indicada por letras minúsculas nas barras de mesma cor (ANOVA; Tukey $p < 0,05$). A redução de atividade quelante de cálcio totalizou: 52,64 (Suco c/ ácido málico), 82,42% (Suco Controle) e 62,98% (Suco c/ LBA).

Além disso, a estabilidade do parâmetro de porcentagem de quelação dos íons cálcio no suco Controle, foi menor, com várias mudanças significativas ao longo do armazenamento (amplitude a-g). Vale ressaltar que o ácido málico permitiu uma menor redução total deste

parâmetro (53%), seguido pelo LBA com 63%. A amostra Controle perdeu 82,42% da capacidade quelante dos íons cálcio em 120 dias de armazenamento. Portanto, os ácidos foram capazes de manter a atividade quelante de cálcio (Ca^{2+}) de modo mais efetivo que com os íons Fe^{2+} . Isso pode ter ocorrido, pois os íons cálcio possuem 3 níveis de ionização, enquanto o ferro possui 4 níveis. Adicionalmente, o primeiro nível de ionização requer mais energia no caso do ferro (762 KJ.mol^{-1} contra 589 KJ.mol^{-1} do cálcio).

Vale lembrar que o ácido málico em solução tem maior capacidade quelante de cálcio em solução (Capítulo 5, item 5.2) e valores semelhantes para o íon ferro, e no suco de yacon, este fato se refletiu apenas para o íon ferro. Também, destaca-se aqui que ambos os ácidos aumentaram a capacidade quelante de ambos os íons, com relação ao Controle. Este resultado destaca e confirma o potencial do LBA como quelante de íons cálcio, quando estudado dentro de uma matriz alimentícia e os mecanismos de interação devem ainda ser esclarecidos.

O único relato válido para comparação, vem da patente da empresa Kraft Foods, sobre uma bebida (BALDWIN et al., 2010) fortificada com cálcio, que possui o LBA (50-90%) complexado com hidróxido de cálcio (5-25%) e ácido cítrico (2-20%). Como já foi mencionado na revisão de literatura, esta bebida foi desenvolvida pelo apelo de que seu consumo regular poderia adiar os efeitos da osteoporose e que nenhum sabor residual foi reportado pelo painel sensorial, porém nenhum valor quantitativo foi mencionado sobre a porcentagem de quelação de cálcio efetivamente atribuída ao LBA. E como já mencionado, a percepção sensorial do suco com LBA não poderá ser acessada por avaliadores no presente estudo. Descontando os resultados encontrados para o Controle (valor médio do Suco c/ LBA – Suco controle), o LBA foi capaz de quelar sozinho 14,8% de íons cálcio no tempo inicial e 6,8% no dia 120 de armazenamento do suco de yacon.

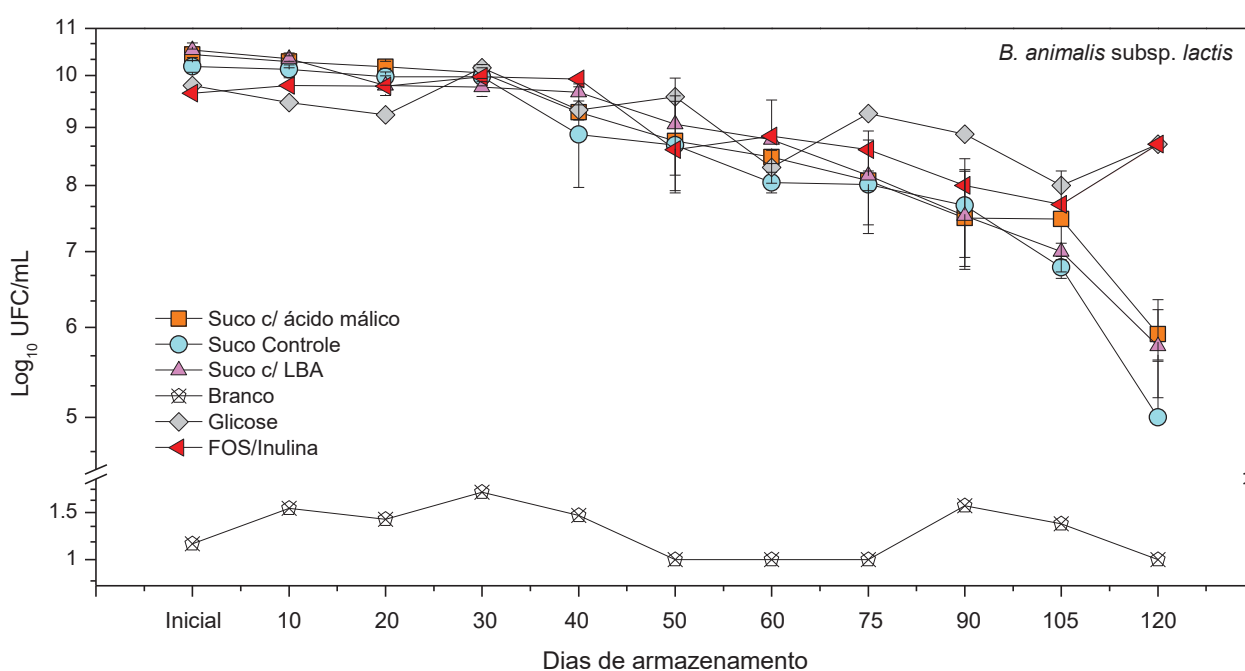
6.8 Influência do armazenamento e do LBA no potencial prebiótico do suco de yacon

Para promover os benefícios atribuídos aos probióticos, eles devem estar presentes e se desenvolver em número suficiente para colonizar o trato gastrointestinal. Esta quantidade foi definida como 10^6 a 10^8 log UFC/mL ou g (WHO, 2001), portanto, abaixo deste valor de crescimento dos probióticos, o produto não é mais considerado funcional com relação ao status de bebida prebiótica. Os Gráficos 26, 27 e 28 trazem o perfil de crescimento dos probióticos *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* respectivamente, utilizando como fonte de carbonos os sucos de yacon, Controle (sem ácido adicionado), com ácido málico e com LBA, além das fontes de carbono FOS/inulina, glicose e

a amostra sem fonte de carbono, para testar o crescimento somente do meio (branco). Considerando os limites estabelecidos, ao menos durante 120 dias os probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* utilizaram as três amostras de suco de yacon como fonte de carbono, desenvolvendo-se em níveis em que o suco de yacon pode ser considerado prebiótico, e o *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* fez o mesmo por 105 dias.

A digestão do suco de yacon não diminui seu potencial prebiótico, que foi equiparável ao potencial da amostra de FOS e inulina puros, até o dia 105 de armazenamento para *B. animalis* e *L. acidophilus*, e 90 dias para o *L. lactis*. Considerando os valores médios apresentados, a glicose como única fonte de carbono, apresentou em sua maioria, valores superiores de crescimento dos probióticos a partir do dia 50 (exceto para *L. lactis*), e pode ser considerada melhor fonte de carbono, se comparada a FOS com inulina, e aos sucos de yacon puro, com LBA e com ácido málico. Usualmente, quando uma fonte de carbono simples é apresentada a probióticos, como a glicose, eles a preferem, e crescem mais e de forma mais estável, se comparado a fontes mais complexas, como FOS + inulina (SOUSA et al., 2015a). Aqui, como a diferença não foi muito pronunciada até o dia 50, de ser lembrado o fato de que o suco de yacon passou por uma digestão *in vitro*, e que provavelmente as fontes de carbono complexas, como FOS e inulina, podem ter sido quebradas em açúcares mais simples e facilmente metabolizáveis.

GRÁFICO 26 – POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO QUANTO AO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA *B. animalis subsp. lactis*.

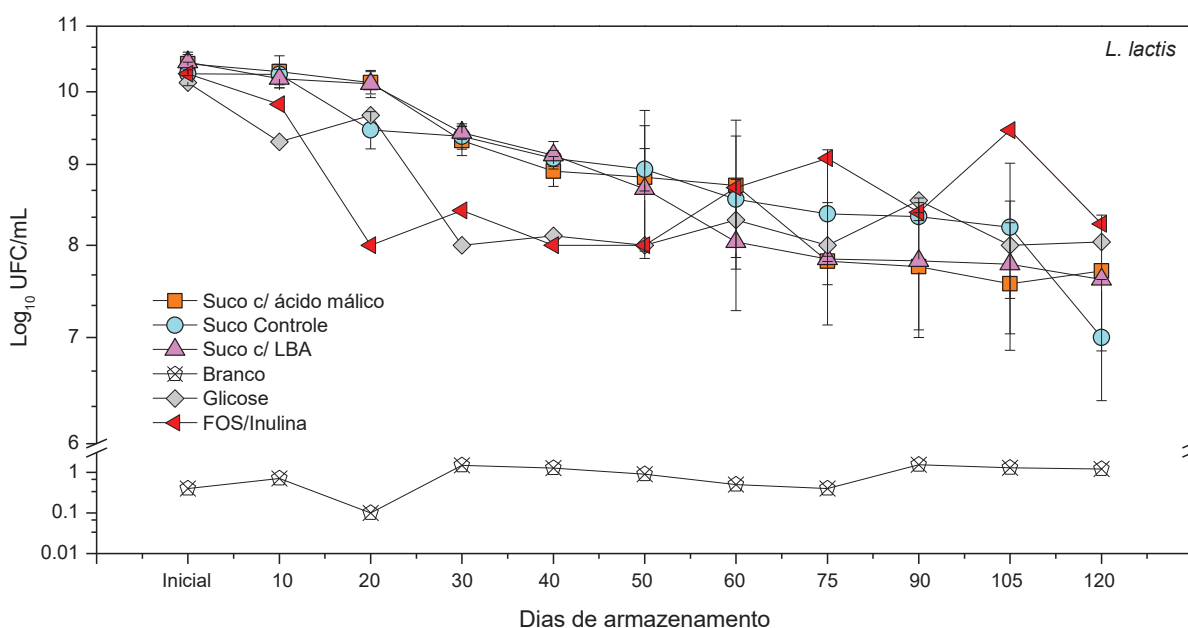


FONTE: A autora (2020).

O LBA não se destacou significativamente como ingrediente prebiótico, e apresentou valores de crescimento dos probióticos superiores ao Controle apenas no dia 120 de armazenamento para o *B. animalis* e *L. lactis*. Para os demais tempos de armazenamento e para o *L. acidophilus*, o perfil de potencial prebiótico do suco de yacon com LBA é muito semelhante ao da amostra Controle. O desenvolvimento inferior da bactéria *B. animalis*, pode ser explicado pelo pH dos meios. A solução de digestão dos sucos, que foi adicionada ao meio de cultura, diminuiu o pH do mesmo, e cada uma contribuiu para uma redução diferente: A solução de digestão do suco de yacon com ácido málico tinha pH médio de 3,43, do suco com LBA de 4,57 e do suco Controle, 6,26.

Rossi et al., (2005) e Watson et al., (2013) confirmaram que a *B. animalis* subsp. *lactis*, fermenta efetivamente glicose, FOS e inulina e além disso, Saarela et al., (2011) estabeleceu a sensibilidade desta cepa a valores de pH inferiores a 4,6. Por este motivo, as amostras de suco de yacon, como fonte de carbono para a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, diminuiu substancialmente seu crescimento (Gráfico 26) a partir do dia 50 de armazenamento refrigerado, se comparada com a fonte de carbono Glicose. Já para o *L. lactis*, esta diferença apareceu apenas no final do armazenamento, dia 120 (Gráfico 27) e para o *L. acidophilus*, a partir do dia 90 (Gráfico 28). Os FOS do yacon são efetivamente metabolizados por *Lactobacillus in vitro* (PEDRESCHI et al., 2003), e os presentes dados são consistentes com este fato.

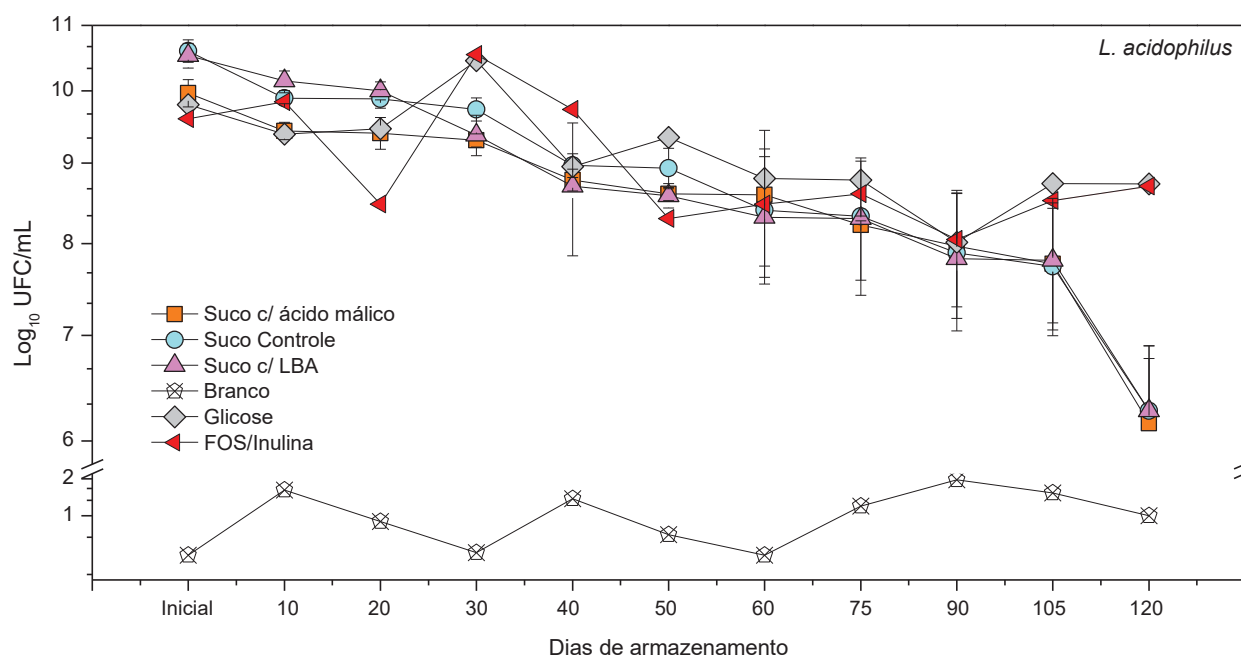
GRÁFICO 27 – POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO QUANTO AO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA *L. lactis*.



FONTE: A autora (2020).

O crescimento dos probióticos no meio sem fonte de carbono foi baixo ou inexistente, e não interferiu nas contagens significativamente maiores apresentadas pelas amostras plaqueadas em meio com fontes de carbono. O mesmo foi encontrado por Sánchez-Zapata et al., (2013), que avaliou o crescimento do *B. animalis* e *L. acidophilus* em MRS-sem glicose, ou seja, sem a fonte de carbono, e encontrou crescimento inexistente ou limitado para ambos, validando o controle negativo. Estudar o comportamento do *L. casei* em alimentos é importante, pois além de probiótico, esta cepa é considerada antimicrobiana contra patogênicos que podem contaminar alimentos e o intestino humano, como a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* (CALDERÓN et al., 2001). A atividade antimicrobiana dos sucos de yacon foram testadas aqui, porém nenhuma atividade foi encontrada (dados não mostrados) contra as bactérias: *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens* e *Salmonella spp.* Ou seja, o suco de yacon, e 1% LBA ou ácido málico não foram capazes de agir como agentes antimicrobianos. Este fato já foi discutido quanto as soluções de LBA e ácido málico 1% no Capítulo 5.

GRÁFICO 28 – POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE YACON DURANTE O ARMAZENAMENTO DE 120 DIAS REFRIGERADO QUANTO AO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA *L. acidophilus*.



FONTE: A autora (2020).

Ademais, uma bebida de yacon confirmadamente prebiótica pode fornecer diversos benefícios já atribuídos a sua matéria-prima, a raiz do yacon como: maior absorção de minerais

no intestino, aumento da resistência do organismo humano aos patógenos, estimulação do crescimento de probióticos no intestino, além da redução do colesterol e controle de diabetes tipo 2 (CAMPOS et al., 2012; HABIB et al., 2011). Saarela et al., (2006) indicou que o *B. animalis* (BB-12®) sobrevive menos em sucos de frutas refrigerados, do que em leite, e isso foi atribuído aos baixos valores de pH. Este fato indica que este suco de yacon, se transformado em bebida simbiótica (prebiótica, e também adicionada de probióticos), teria um comportamento diferente durante sua vida útil, e provavelmente o status de simbiótico seria perdido antes de 105 dias de armazenamento.

6.9 Bioconversão dos açúcares

Perfis cromatográficos são amplamente utilizados no estudo de produtos vegetais, permitindo a comparação e sugestão de classes de compostos químicos. A Fig. 14 mostra os cromatogramas do suco de yacon, nos tempos inicial e final (120 dias), nos quais foi possível observar picos com intensidades diferentes. Os compostos-alvo eram açúcares de alta polaridade, pois contêm vários grupos hidroxila em suas estruturas. Houve variação na composição do suco de yacon, tanto entre os tratamentos (com e sem ácidos), quanto entre os dias (inicial vs. 120 dias).

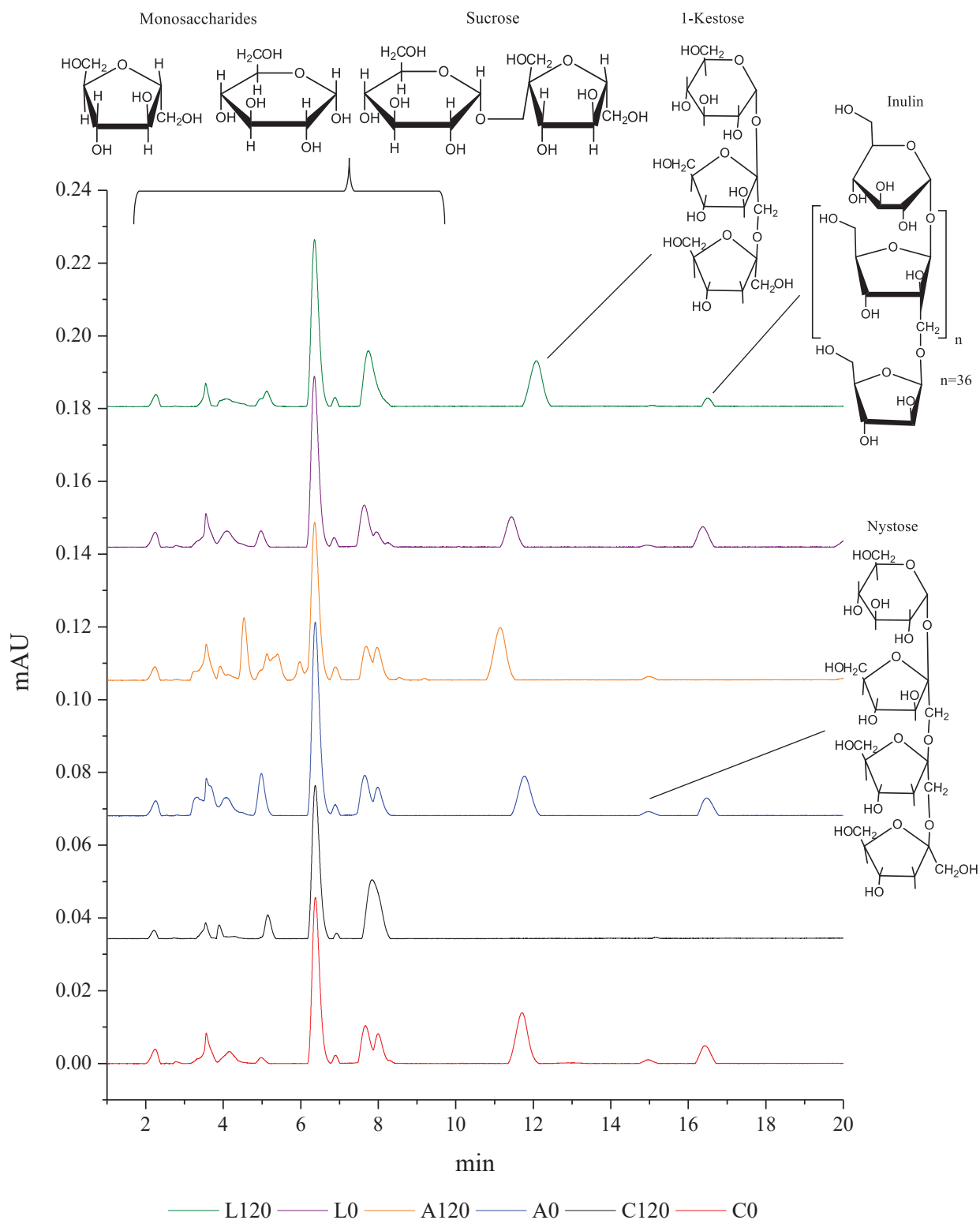
Os cromatogramas podem ser divididos em duas áreas distintas. Segundo Mabrok et al., (2018) na região de 5-10 min, ocorre uma eluição de açúcares do tipo dissacarídeo, como a sacarose, e entre 0-5 min, os monossacarídeos como glicose e frutose. Além disso, dois grupos de FOS de cadeia curta são reconhecidos, 1-kestose e nistose entre 11-15 min, completando com a inulina em 17 min.

Foi então verificado, pelos perfis cromatográficos, que os ácidos málico e LBA, foram capazes de impedir a hidrólise completa dos açúcares complexos, quando comparados os perfis L120, A120 e C120. Isso ocorreu porque os FOS são instáveis nas condições de processamento e armazenamento, enquanto a inulina é termicamente estável nos alimentos, mas ocorre alguma hidrólise, em pH baixo (GLIBOWSKI; SKRZYPCZAK, 2017; TIEFENBACHER, 2019).

Observando que a ligação β (2 $\rightarrow$ 1) é parcialmente hidrolisada em condições de pH ácido, as mesmas ligações β (2 $\rightarrow$ 1) da frutose, que são resistentes às enzimas de mamíferos, são responsáveis pelo estado prebiótico destes frutanos. Assim, essas hidrólises resultam em sacarose, glicose e frutose livres. Além disso, foi sugerido aqui que há uma hidrólise enzimática parcial da inulina em FOS de cadeia curta feita pela endoinulinase (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ

et al., 2020), como os picos de inulina quase ou completamente desapareceram e 1-kestose ligeiramente aumentou, para os sucos adicionados de ácido.

FIGURA 14 – INDICAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DE AÇÚCARES POR HPLC



O LBA e o ácido málico já demonstraram sua eficácia na redução da atividade enzimática do suco de yacon (MARQUES et al., 2020), e podem ter atuado aqui, controlando também a endoinulinase, pois açúcares do tipo frutanos foram eliminados apenas do cromatograma C120. Parcialmente, a bioconversão dos frutanos poderia ocorrer se cepas probióticas fossem adicionadas diretamente ao suco, sugerindo outra categoria de produto para estudos posteriores: o suco simbiótico de yacon.

6.10 Conclusões

O suco de yacon refrigerado pode ser considerado uma bebida funcional prebiótica, durante um armazenamento de longo prazo, por pelo menos 120 para os probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, e 105 dias para o *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. A digestão do suco de yacon não diminui seu potencial prebiótico, que foi equiparável (2% no meio de cultura MRS) ao potencial da amostra de FOS e inulina (2%), até o dia 105 de armazenamento para *B. animalis* e *L. acidophilus*, e 90 dias para o *L. lactis*. Contudo, em média, a glicose (2%) apresentou maiores valores de crescimento dos probióticos a partir do dia 50 de armazenamento, e ainda é melhor fonte de carbono para as bactérias estudadas, se comparada a FOS com inulina, e ao suco de yacon puro, com LBA e com ácido málico.

Em resposta as hipóteses, temos:

1. O suco de yacon consegue manter seu potencial prebiótico durante 180 dias de refrigeração: Considerando os 120 de vida útil analisados, para o desenvolvimento das espécies probióticas *Lactobacillus* a hipótese 1 é verdadeira, para o *B. animalis subsp. lactis*, não, que foi de apenas 105 dias.
2. O LBA aumenta o potencial prebiótico do suco de yacon: Não, o LBA no suco de yacon se destacou significativamente, com valores de crescimento dos probióticos superiores ao suco Controle, no dia 120 de armazenamento para o *B. animalis* e *L. lactis*. Para os demais tempos de armazenamento e para o *L. acidophilus*, o perfil de potencial prebiótico do suco de yacon com LBA é semelhante ao da amostra Controle.
3. O suco de yacon tem sua vida útil ampliada com a adição do LBA e do ácido málico: Sim, de 60 dias do suco Controle, para 120 dias quando a contagem microbiológica de Bolores e Leveduras atingiu o nível permitido por legislação

(10^3 UFC/mL). Ou seja, os ácidos conseguem de forma similar, dobrar o tempo de vida útil do suco de yacon refrigerado, com manutenção e diminuição do pH das amostras. Além disso, os ácidos mantiveram efetivamente a cor inicial do suco de yacon, com escurecimento bem menos pronunciado que a amostra Controle. Adicionalmente, ambos ácidos aumentaram a capacidade quelante de metais do suco de yacon e o LBA foi comparável ou superior ao málico até o dia 30 para íons ferro, e 105 dias para íons cálcio. O ácido málico apresentou a maior capacidade de retenção de compostos fenólicos, seguido do LBA, com diferenças de 6,8% e 10% da amostra Controle. Quanto a atividade antioxidante, enquanto o suco Controle perdeu mais de 50% da atividade antioxidante, o ácido málico permitiu a redução de 38-44% da atividade antioxidante e o LBA de 34-39%. Portanto, o LBA conseguiu manter de forma mais eficaz o potencial antioxidante dos sucos por 120 dias, mesmo que a redução deste parâmetro tenha sido estatisticamente significativa.

Por fim, o LBA apresentou efetividade como acidulante, conservante, quelante de cálcio e ferro, antioxidante, que permitiu a estabilidade dos parâmetros de cor do suco de yacon, porém sem efeito significativo como ingrediente prebiótico.

CAPÍTULO 7 – Perfil sensorial do suco de yacon⁹

7.1 Introdução

Alguns pesquisadores já avaliaram as características sensoriais de bebidas à base de yacon: Aceitação sensorial de iogurte com xarope de yacon (DE LIMA MENDES et al., 2019), efeito do yacon na aceitação sensorial de kefir (GONÇALVES et al., 2018), qualidade sensorial do suco de yacon em pó (FRANCO et al., 2016) e a aceitabilidade sensorial de pastas à base de yacon sem açúcar (GRANATO et al., 2011). Porém, nenhuma avaliação sensorial foi encontrada no suco de yacon, usando a raiz como ingrediente principal. Considerando este suco um desenvolvimento promissor de um novo produto saudável, a avaliação sensorial completa, ou seja, perfil sensorial e aceitação, deve ser avaliada.

Diante disso, o Perfil Flash, derivado do Perfil Livre, é um método adequado e relativamente rápido para realizar o perfil sensorial. As vantagens do Perfil Flash são a equipe treinada não obrigatória e o rico vocabulário resultante, dos consumidores (ALBERT et al., 2011). Os consumidores, como avaliadores, geram uma lista de atributos individuais e são questionados sobre a diferença entre as amostras para cada atributo listado (LIU et al., 2016; MARQUES et al., 2019).

Como a aplicação do ácido lactobiônico ainda não passa por avaliações sensoriais, outras estratégias de avaliação da qualidade dos sucos com adição de ácido lactobiônico tornam-se importantes. Um método que tem sido usado para avaliar a qualidade dos alimentos é o *E-nose* (nariz eletrônico), que é baseado em matrizes de gases não seletivos ou sensores líquidos com uma seletividade ampla e parcialmente sobreposta para a identificação de compostos voláteis (MAKIMORI; BONA, 2019). Essas matrizes de sensores são acopladas a um modelo de reconhecimento de padrões, que é capaz de recuperar informações de sinais complexos (HADDI et al., 2014). Embora os dados quimiométricos resultantes não substituam as respostas sensoriais, uma combinação de ambos é altamente recomendada. Sua combinação não é linear, mas foi explorada com resultados de sucesso na ciência de alimentos, e conhecida como sensometria (QANNARI, 2017; SEISONEN; VENE; KOPPEL, 2016; SILVELLO; ALCARDE, 2020; YIMENU; KIM; KIM, 2017).

⁹ Deste Capítulo 7, surgiu o artigo pronto intitulado: *Sensory profile estimation of yacon (Smallanthus sonchifolius) juice acidified with lactobionic acid: Combination of Flash Profile, E-nose and sensometrics*, 2021.

Assim, o objetivo deste capítulo foi estimar o perfil sensorial do suco de yacon acidificado com ácido lactobiônico, por meio da correlação dos resultados do Perfil Flash de sucos de yacon com ácidos málico e tartárico, com os dados do *E-nose* e sensometria.

7.2 Resultados e discussão

7.2.1 Seleção

Das 39 pessoas que participaram da seleção, 19 foram consideradas capazes de reconhecer pelo menos 70% dos gostos básicos e alcançaram o índice de aptidão para o odor. Destes, 14 pessoas aceitaram participar do Perfil Flash. Os resultados detalhados para a seleção podem ser encontrados no Apêndice C (Gráficos 1 e 2 e Quadros 1 e 2).

7.2.2 Perfil Flash

Como o suco de yacon pode ser considerado um produto novo, os descritores levantados pelo Perfil Flash são muito importantes (Tabela 13). *Cor amarela* e *Ácido* foram citados para as amostras com ácido. *Cor verde* foi mencionada para as amostras controle, sem ácido, mostrando a diferença perceptível de cor entre as amostras (Fig. 15). *Detox* apareceu para as amostras controle, provavelmente devido à cor verde, e também *Água de coco*, *Suco de maçã* e *Água de batata*, provavelmente devido à ausência do gosto ácido. Isso indica que o suco de yacon sem ácidos conservantes tem um sabor mais suave que as amostras com ácido.

Tabela 13 – Descritores levantados para o suco de yacon controle e com ácidos conservantes

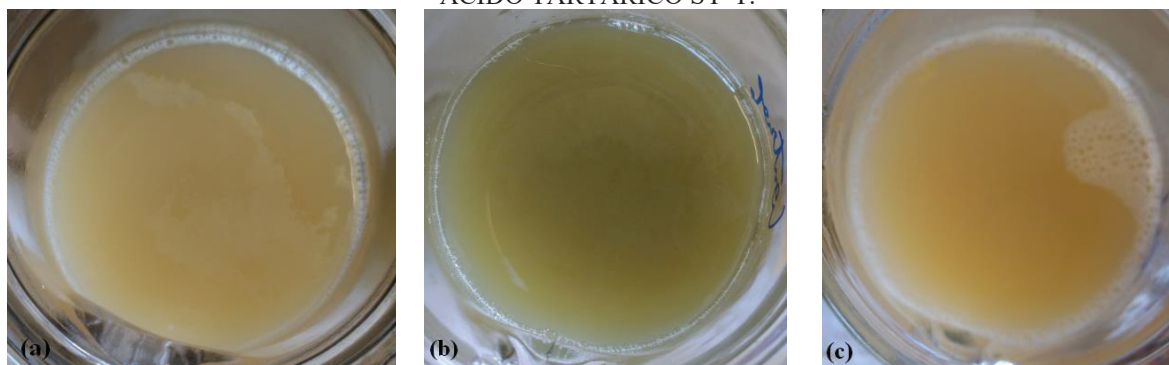
Descritor	%	Descritor	%	Descritor	%
Ácido	93	Flavor de ervas	14	Cor perolada	7
*Cor verde	79	Flavor de cereais	14	*Detox	7
Cor amarela	71	Aroma doce	14	*Suco de maçã	7
Viscoso	64	Opaco	14	Folhas/ Fresco	7
Doce	57	Laranja/Couve	14	*Água de coco	7
Amargo residual	43	Adstringente	14	*Água de batata	7
Turvo	36	Caldo de cana	14	Baunilha/Umami	7
Particulado	36	Salgado	7	Flavor de soja /Terroso	7
Ácido residual	21	Frutado	7	Flavor de amido	7

14 menções foram consideradas 100%. * descritores mencionados apenas para amostras controle. Flavor = sabor + odor. FONTE: A autora (2021).

Não há nenhum outro estudo de suco de yacon puro para comparar os descritores compilados aqui. Embora seja possível encontrar correlação entre os descritores com os chamados produtos-de-grãos ou leguminosas de acordo com o estudo de Vara-Ubol et al., (2004). Os compostos químicos identificados como 1-Octen-3-ol, 1-octen-3-ona, pentanol e acetofenona foram relacionados a produtos com odor de feijão/leguminosas, que recebem também os descritores *Flavor de amido*, *Odor de soja*, *Sabor doce* e *Terroso*, *Cor verde*, *Folhas* e *Mofo*. Além disso, o *Flavor de amido* e a sensação de partículas estão relacionadas à sensação de pó, ou seja, a sensação de amido não dissolvido em produtos vegetais feitos de raízes (VARA-UBOL; CHAMBERS; CHAMBERS, 2004). Além disso, estes compostos químicos citados são sabores conhecidos, usados isoladamente ou combinados com adoçantes como raízes de yacon, para potencializar a sensação de refrescância em diversos produtos, nas indústrias farmacêutica, cosmética e de rações (PATRON; DITSCHUN, 2016). Assim, é possível que os sabores de ervas e folhas notados estejam relacionados à percepção de frescor.

As raízes de yacon são fontes conhecidas de fenólicos como ácidos cafeico, ácido clorogênico e catequina (SILVA et al., 2018), e estes compostos têm relação com o amargor e a adstringência (FERRER-GALLEGO et al., 2014) em bebidas. A percepção de particulados também está ligada aos descritores *Viscoso* e *Turvo*, duas percepções completamente diferentes, provenientes de mecanorreceptores na língua e também na visão, respectivamente. Este fato foi corroborado pela literatura, visto que existe uma correlação linear entre a classificação da viscosidade sensorial e o comportamento do fluxo instrumental das fibras alimentares solúveis, utilizando o descritor turvo para as soluções dos polissacarídeos estudados (ARORA et al., 2016).

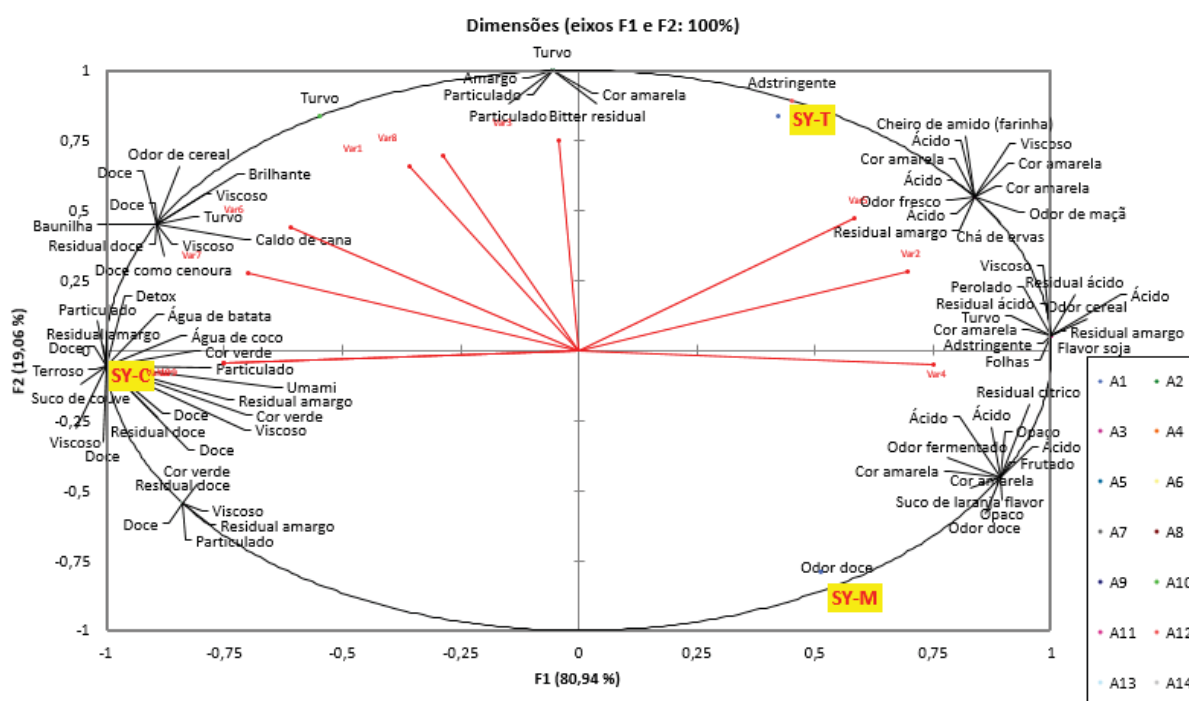
FIGURA 15 – SUCO DE YACON COM (A) ÁCIDO MÁLICO SY-M, (B) CONTROLE SY-C, E (C) COM ÁCIDO TARTÁRICO SY-T.



FONTE: A autora (2021).

O Gráfico 29 destaca as correlações de descritores com as diferentes amostras. *Doce*, *Cor verde*, *Terroso*, *Água de batata* e *Umami* foram relacionados à amostra controle (SY-C), enquanto *Viscoso* aparece em todas as amostras. O *Ácido* foi relacionado apenas às amostras com adição de ácido. Isso provavelmente significa que o ácido adicionado mascarou a percepção *Doce* e *Umami*, encontrada para o SY-C. *Opaco* foi mencionado para SY-M, e *Perolado* para SY-T, embora nenhum deles indique percepções positivas ou negativas a princípio, pois ambos têm cor amarela.

GRÁFICO 29 – PCA DOS DESCRITORES DO PERFIL FLASH DO SUCO DE YACON, COM ÁCIDO MÁLICO (SY-M), ÁCIDO TARTÁRICO (SY-T) E CONTROLE, SEM ÁCIDOS (SY-C).



FONTE: A autora (2021).

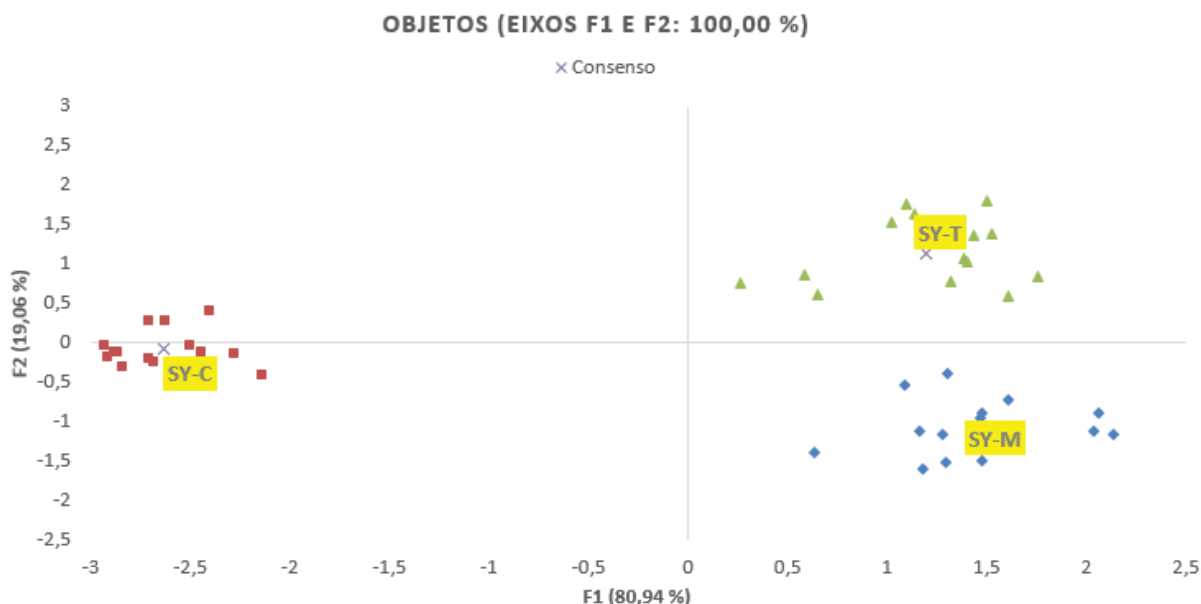
Neste estudo, o Perfil Flash mostrou-se eficiente para a descrição e diferenciação do suco yacon, entre amostras de controle e as adicionadas de ácidos conservantes. Além disso, houve uma compilação eficiente de terminologia, com termos fortemente ligados a este suco à base de plantas. Valores residuais semelhantes e baixos foram percebidos na resposta dos avaliadores 1,52 para a amostra controle (SY-C); 3,98 para SY-M com ácido málico e 4,81 para a amostra com ácido tartárico SY-T (ver Apêndice C – Gráfico 2). Isso indica uma percepção homogênea e consenso em relação aos diferentes sucos yacon.

Os valores residuais individuais para avaliadores podem ser considerados baixos <1,8, o que é uma boa característica para um painel não treinado. A configuração consensual

encontrada pode ser observada no Gráfico 30. O biplot da análise de procrustes generalizada (GPA) confirmou a diferenciação das amostras e a matriz de consenso através de uma representação clara da percepção dos avaliadores. Um fato importante é que a soma da explicação dos dois primeiros fatores chegou a 100%, e a primeira (F1) chegou a 80,94%. Além disso, a distinção eficiente entre as amostras foi confirmada por $p < 0,0001$ (alfa 0,05) no teste dimensional entre F1 e F2.

As amostras SY-M e SY-T estão positivamente correlacionadas com F1 e negativamente correlacionadas com F2, enquanto SY-C está negativamente correlacionado com F1 e F2. Adicionalmente, a cor provou ser um atributo importante ao distinguir essas amostras, pois a *Cor verde* foi negativamente correlacionada com F1 e F2 também, e separou o suco controle dos demais. Aspectos visuais como cor são muito importantes para os consumidores, os quais a acessam na primeira percepção sobre produtos alimentícios (BORDIM et al., 2021). A obtenção de descritores para pesquisa e desenvolvimento de novos produtos é importante, para melhor entender as decisões feitas pelo consumidor.

GRÁFICO 30 – CONFIGURAÇÃO CONSENSUAL DOS RESULTADOS DO PERFIL FLASH PARA AMOSTRAS DE SUCO YACON.



FONTE: A autora (2021).

Analisando as amostras na matriz de consenso, cada suco pode ser correlacionado com sua terminologia, de acordo com os termos com a maior correlação de cada avaliador, $|r| > 0,80$, como mostra a compilação na Tabela 14.

Tabela 14 - Atributos melhor correlacionados com as dimensões 1 e 2 $|r| > 0,80$ no resultado do Perfil Flash do suco yacon.

Avaliador	F1	F2
A1	Cor amarela (0,837); Viscoso (0,837); Odor de ervas (0,892); Salgado (-0,892); Ácido (0,837); Cor verde (-0,998); Doce (-0,892); Turvo (0,837)	-
A2	Cor verde (-0,998); Cor perolada (0,998); Sabor de cereal (0,998); Doce (-0,998); Ácido (0,998); Residual amargo (-0,998); Viscoso (0,998); Particulado (-0,998)	Doce (-0,837)
A3	Cor verde (-0,998); Cor amarela (0,837); Sabor frutado (0,892); Ácido (0,837); Residual amargo (0,837); Residual ácido (0,998); Doce (-0,998); Umami (-0,998); Particulado (-0,998)	Turvo (0,998)
A4	Turvo (0,998); Cor amarela (0,837); Ácido (0,998); Viscoso (0,998); Residual amargo (0,998); Cor verde (-0,998); Sabor de água de coco (-0,998); Folhas (0,998)	-
A5	Caldo de cana (-0,892); Terroso (-0,998); Água da batata (-0,998); Ácido (0,892); Doce (-0,998); Residual doce (-0,837); Cor verde (-0,998); Cor amarela (0,837)	-
A6	Cor amarela (0,837); Cor verde (-0,998); Odor doce (0,892); Ácido (0,892); Doce (-0,892); Sabor baunilha (-0,892); Resíduo cítrico (0,892); Resíduo doce (-0,892)	-
A7	Cor verde (-0,837); Cor amarela (0,837); Viscoso (-0,892); Sabor maçã (0,837); Ácido (0,837); Doce (-0,837)	Residual amargo (0,998); Particulado (0,998)
A8	Viscoso (-0,998); Ácido (0,837); Doce (-0,998); Sabor de soja (0,998); Cor amarela (0,837); Residual ácido (0,998); Residual doce (-0,998)	-
A9	Cor verde (-0,837); Sabor de amido (0,837); Suco de laranja (0,892); Doce (-0,892); Chá de ervas (0,837); Caldo de cana (-0,892)	Cor amarela (0,998)
A10	Residual amargo (-0,837); Odor de fermentação (0,892); Ácido (0,998); Viscoso (0,837)	Turvo (0,837); Particulado (0,998)
A11	Cor verde (-0,998); Cor amarela (0,998); Brilhante (-0,892); Opaco (0,892); Ácido (0,837); Residual amargo (-0,998); Odor fresco (0,837); Suco de couve (-0,998); Adstringente (0,998)	-
A12	Ácido (0,892); Opaco (0,892); Doce como cenoura (-0,892); Viscoso (-0,892)	Adstringente (0,892)

Avaliador	F1	F2
A13	Cor verde (-0,998); Cor amarela (0,892); Ácido (0,892); Suco de couve (-0,998); Suco detox (-0,998); Sabor de cereal (-0,892); Viscoso (-0,892)	-
A14	Particulado (-0,837); Viscoso (-0,837); Ácido (0,892); Cor amarela (0,892); Cor verde (-0,998); Turvo (-0,892)	Amargo (0,998)

FONTE: A autora (2021).

7.2.3 Resultados quimométricos do *E-nose*

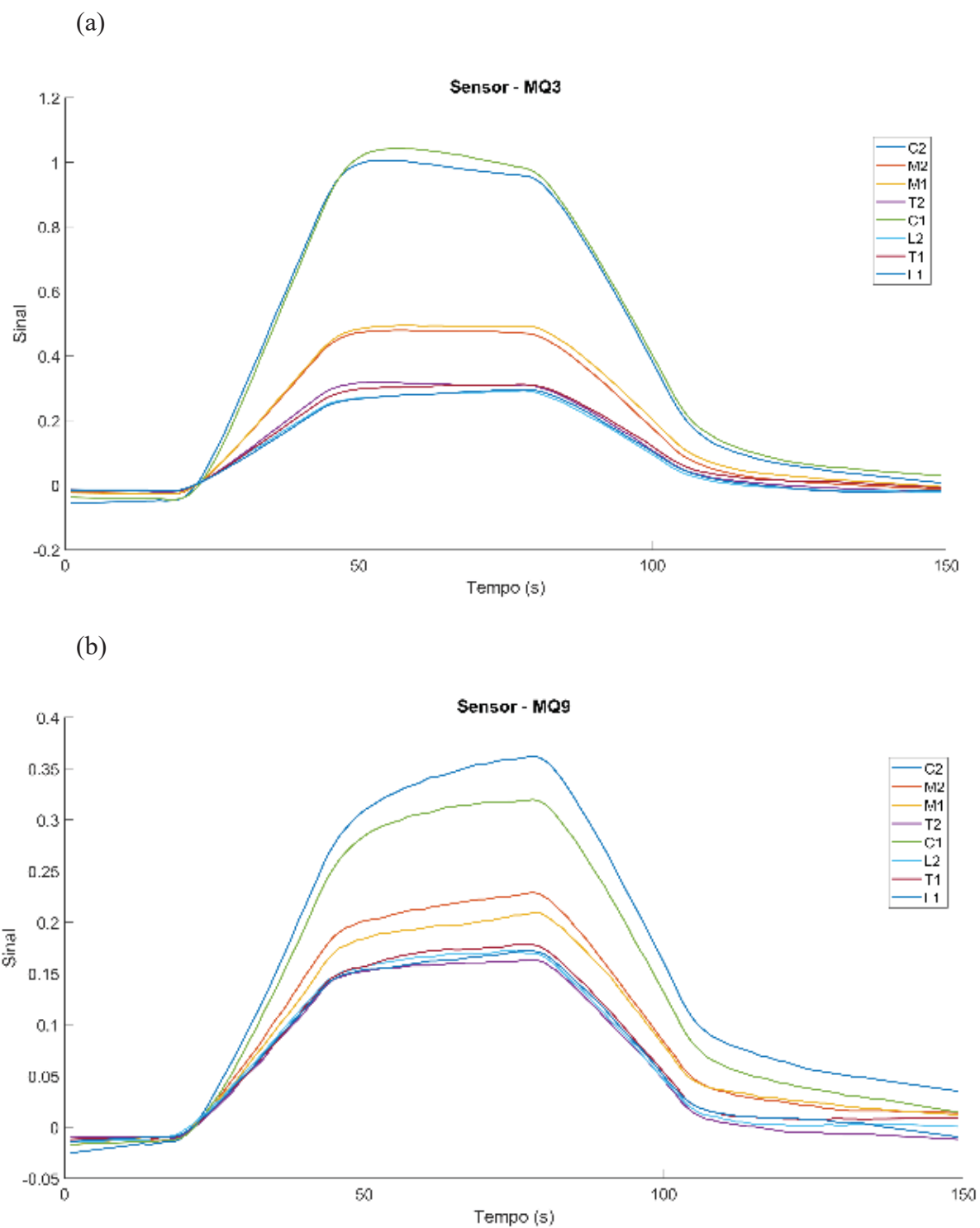
Na tentativa de encontrar correlação do suco de yacon adicionado de ácido lactobiônico SY-L (L1 e L2) com outras amostras avaliadas pela análise sensorial, a análise do *E-nose* avaliou também as amostras: SY-C (C1 e C2), SY-M (M1 e M2) e SY-T (T1 e T2). O sinal transitório típico obtido pelo *E-nose* nos sensores MQ3 e MQ9 após o pré-tratamento foi ilustrado no Gráfico 31.

No PCA, o primeiro fator (F1) representou 97,46% da variância contida nos dados e o Gráfico 32 mostra os escores (valor de representatividade daquela variável no fator) de cada amostra no F1. Em primeiro lugar, destacou-se a boa repetibilidade para o sinal obtido nas repetições de cada amostra. Os valores de pontuação no F1 se aproximaram muito, e o sinal obtido foi muito semelhante para a repetição de cada amostra (Gráfico 31).

Com base na impressão olfativa obtida através do nariz eletrônico, a amostra SY-C (quadrante positivo do F1) apresentou uma maior diferença em relação às outras amostras, corroborada pelo Perfil Flash. As amostras SY-T e SY-L apresentaram um padrão de aroma semelhante, o que é um resultado promissor, pois o suco de yacon com ácido lactobiônico só poderia ser avaliado pelo *E-nose*.

De acordo com o conjunto de dados em F1 (Gráfico 33), a amostra SY-C apresentou um sinal mais intenso para os sensores MQ3, MQ6 e MQ9. Os outros sensores não apresentaram sinal relevante para a discriminação das amostras. A amostra SY-M, por outro lado, apresentou um sinal, nos mesmos sensores já nomeados, ligeiramente superior ao obtido para as amostras SY-T e SY-L. Entendendo melhor o que cada sensor representa, o sensor MQ3 tem maior sensibilidade para álcoois de cadeia curta (como etanol) e os sensores MQ6 e MQ9 têm maior sensibilidade para hidrocarbonetos de cadeia curta (como propano e metano, por exemplo) (MAKIMORI; BONA, 2019).

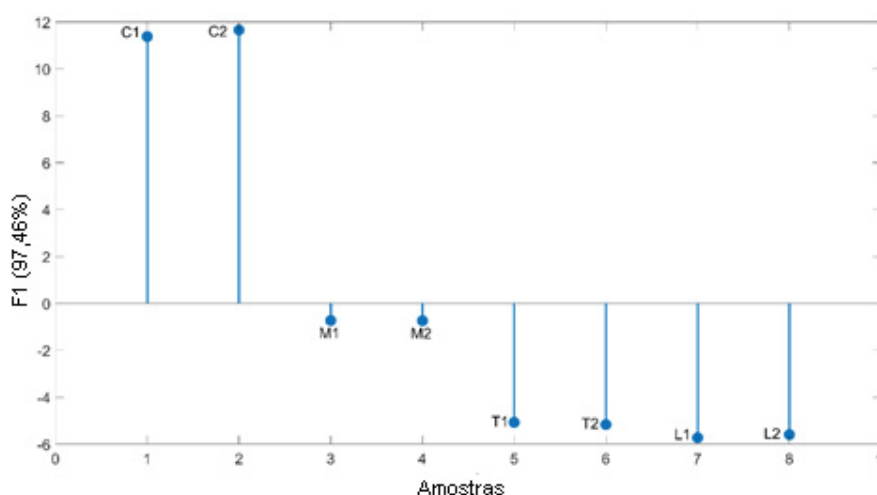
GRÁFICO 31 – SINAL TRANSITÓRIO, APÓS PRÉ-TRATAMENTO, PARA OS SENSORES (A) MQ3 E (B) MQ9.



FONTE: A autora (2021).

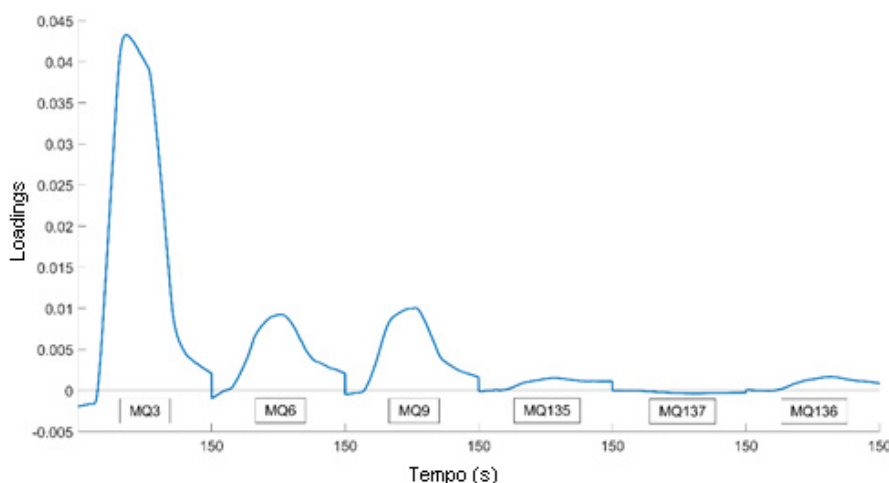
Como todas as 4 amostras passam pelo mesmo processamento, incluindo a pasteurização, a grande diferença entre SY-C e as outras amostras, deve ser a consequência da adição de ácido. Antes de congelar, o SY-C pode ter desenvolvido um leve processo de fermentação, que originou álcoois de cadeia curta e reorganizou quimicamente outros compostos como ésteres e compostos carbonil. O metanol não é um subproduto da fermentação, mas pode ser originado de heteropolissacarídeos durante a maceração (BOTELHO et al., 2020; JACKSON, 2008). Além disso, enzimas como pectinases que poderiam estar agindo no SY-C preferem pH alcalino, como o deste suco (NIGHOJKAR; PATIDAR; NIGHOJKAR, 2019). Assim, os ácidos podem ter suprimido também essa reação, resultando em compostos de cadeia curta menos voláteis.

GRÁFICO 32 – GRÁFICO DE ESCORES PARA OS COMPOSTOS VOLÁTEIS NAS AMOSTRAS ANALISADAS NO NARIZ ELETRÔNICO.



FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 33 – SINAIS NOS SENSORES DO E-NOSE PARA F1.

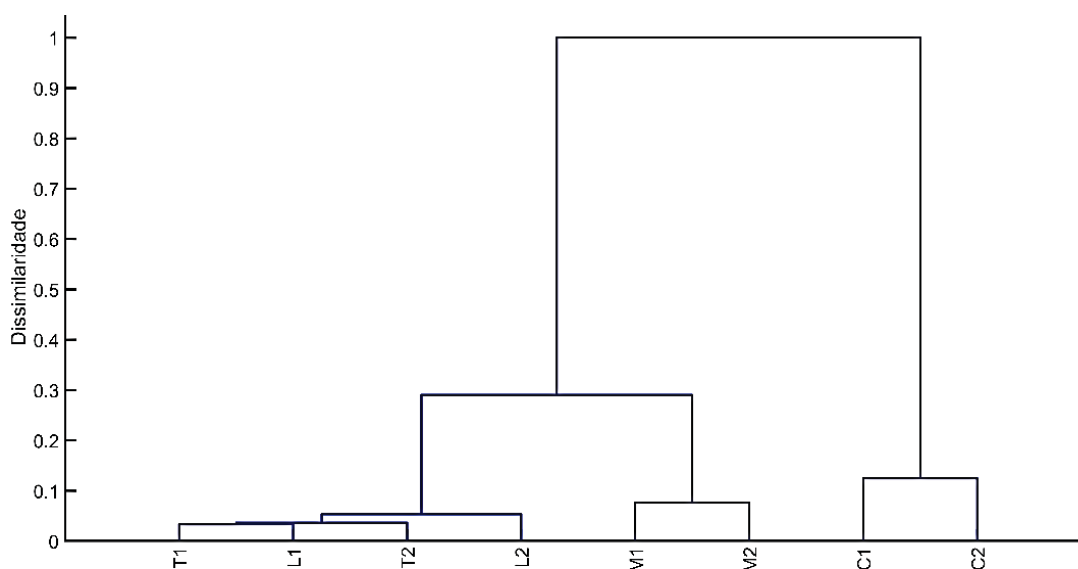


FONTE: A autora (2021).

Quanto à diferença entre SY-M e SY-T, o ácido tartárico reduziu mais o pH do suco yacon devido ao seu pKa, 2,38 contra 2,66, no primeiro dia de armazenamento (MARQUES et al., 2020), o que explica menos reações e compostos de cadeia curta. E o desempenho do ácido lactobiônico pode estar ligado às suas propriedades antioxidantes e quelante de metais (CARDOSO et al., 2019b), que protegem a hidrólise dos compostos pela combinação de pH baixo e formação de complexos metálicos. Sabe-se que os quelantes metálicos reduzem a formação de compostos voláteis na carne tratada com irradiação, por exemplo (ISMAIL et al., 2009), e bloqueiam a atividade obstrutiva de metais catalíticos presentes nos alimentos (ALLEN, 2015). O ácido lactobiônico está possivelmente desempenhando este papel e de maneira mais intensa do que os ácidos tartárico e málico.

Para comprovar, foi realizada uma análise de cluster utilizando-se o método Ward e a distância euclidiana como métrica de similaridade. O dendrograma no Gráfico 34 confirma que a amostra SY-C apresentou grande diferença em relação às outras amostras. Esta é uma indicação adequada de que os resultados sensoriais e quimimétricos do *E-nose* inclinaram para a mesma direção diferenciando amostras de suco de yacon. As amostras SY-L e SY-T formaram um grupo com uma semelhança de 94,70%. Essas amostras ficaram agrupadas com a amostra SY-M para formar um grupo com 70,98% de semelhança.

GRÁFICO 34 – DENDROGRAMA PARA AMOSTRAS DE SUCO DE YACON ANALISADAS NO NARIZ ELETRÔNICO.



FONTE: A autora (2021).

Os resultados do *E-nose* indicaram que o perfil aromático das amostras de ácido lactobiônico é bastante semelhante ao perfil do SY-T. Assim, espera-se que se o suco com ácido lactobiônico se fosse avaliado no Perfil Flash, teria um comportamento semelhante ao observado pelo suco com ácido tartárico. Pode-se inferir, então, que o suco yacon com ácido lactobiônico pode ser sensorialmente semelhante ao SY-T em relação a compostos voláteis e odor. Considerando todos os descritores de odor atribuídos ao SY-T, que assim sugere-se aqui serem aplicados ao SY-L, temos: Flavor de ervas, de soja, de cereal e folhas, e de amido. Quanto à cor amarela perolada, essa característica já foi declarada nos Capítulos 4 e 6.

7.2.4 Aceitabilidade e intenção de compra do suco de yacon

Mais do que compilar os descritores para o suco de yacon, o primeiro passo da técnica do Perfil Flash permitiu mostrar perfis/categorias de terminologia levantados. Com isso, a predominância de adjetivos neutros é evidenciada pelas taxas de aceitação (Tabela 15). Ricarte et al., (2020) mostraram em uma compilação de estudos sensoriais de produtos yacon, que nem sempre o yacon melhorou a aceitação quando adicionado a um produto. As taxas de consumidores que *certamente comprariam* são consideradas baixas, e essa provavelmente é a principal razão pela qual o suco de yacon é mais estudado quando misturado com outros sucos. Mesmo assim, o SY-T soma 67% contando os consumidores que *certamente ou talvez comprariam*, o que não é um resultado desanimador no desenvolvimento deste produto.

Tabela 15 – Aceitação, avaliação hedônica e intenção de compra do suco de yacon

	SY-C	SY-M	SY-T
Certamente compraria	30%	26%	26%
Talvez compraria	29%	29%	41%
Não compraria	41%	45%	33%
Cor/aparência	6,57 ^a ±1,72	5,69 ^a ±2,20	6,76 ^a ±1,89
Odor	5,63 ^a ±1,96	5,82 ^a ±1,71	5,76 ^a ±1,88
Sabor/Sensação na boca	5,16 ^a ±2,30	5,71 ^a ±2,37	5,31 ^a ±2,10
Aceitabilidade global	5,45 ^a ±2,00	5,75 ^a ±1,92	5,57 ^a ±1,90

SY-C é o controle de suco de yacon, sem adição de ácido; SY-M tem 1% de ácido málico e SY-T tem 1% de ácido tartárico. A análise estatística foi realizada entre as amostras de suco, não apareceu diferença significativa ($p < 0,05$) segundo o teste de Duncan. FONTE: A autora (2021).

Nenhum dos atributos de aceitação difere significativamente entre as amostras de suco, o que não era esperado, pois o SY-C tem um perfil sensorial completamente diferente, sendo

um suco verde de sabor neutro. Já os outros dois são amarelos e ácidos. Embora isso possa ter acontecido porque todas as amostras eram frescas, servidas na mesma semana de produção, com mais dias de vida útil provavelmente teriam um resultado diferente. Além da cor/aparência, onde o SY-T spresentou leve destaque, os outros atributos receberam taxas mais elevadas para o SY-M, afirmando que, mesmo não significativamente, as amostras adicionadas por ácido receberam notas ligeiramente mais altas. A amostra controle de suco de yacon não foi menos aceita. O único fato que deve ser destacado aqui é a menor vida útil do SY-C, devido à ausência de um ácido conservante. Como mostrado no Capítulo 6, o SY-C tem uma vida útil de 60 dias, enquanto as amostras adicionadas por ácido teriam 105 dias (MARQUES et al., 2021).

Como mencionado, este é o primeiro relato de um perfil sensorial, com terminologia própria, para descrever um suco de yacon puro. Durante essa avaliação hedônica, os consumidores mencionaram várias vezes que o gosto ácido era muito pronunciado no SY-M e no SY-T, portanto, o 1% adicionado poderia ser reconsiderado em estudos posteriores. E essa é a principal razão para uma avaliação sensorial completa no desenvolvimento de alimentos, para ver se a melhor otimização dos ingredientes seria aprovada para os consumidores.

7.3 Conclusão

Os dados sensométricos do nariz eletrônico foram bem sucedidos para correlacionar o suco de yacon com ácido lactobiônico adicionado e outras amostras semelhantes de suco de yacon. O SY-L apresentou semelhança com o SY-T em relação aos sinais dos compostos voláteis. Além disso, o Perfil Flash, E-nose e sensometria mostraram-se úteis para diferenciar as amostras e analisar os descritores mais bem correlacionados com cada uma. Adicionalmente a combinação de metodologias avaliou o potencial de um produto adicionado de um novo conservante/antioxidante em comparação com os utilizados atualmente.

Então, a combinação destes métodos juntamente com a análise de dados sensométricos, permitiu uma avaliação mais extensa de um produto alimentício adicionado com ácido lactobiônico, ainda não licenciado para a análise sensorial. Os próximos passos podem ajudar a esclarecer os compostos voláteis do suco de yacon, relacionando por exemplo resultados de cromatografia gasosa com os dados sensoriais e de *E-nose*.

CAPÍTULO 8 – Considerações finais e produção científica

Considerações finais

a) A imersão das raízes em ácido cítrico anteriormente à extração do suco não demonstrou efeito significativo na manutenção de compostos bioativos do suco de yacon, já o branqueamento e a adição de ácido foram significativos, em 48 h de refrigeração. As melhores condições foram: branqueamento a vapor (10 min) + adição de LBA diretamente ao suco;

b) Determinou-se que a concentração ideal de ácido lactobiônico onde se obteve um suco de yacon estável ao armazenamento foi de 1%;

c) Os ácidos LBA e málico se destacaram na conservação do suco de yacon e manutenção de seus compostos bioativos, quando comparados aos ácidos ascórbico, cítrico e tartárico. O ácido málico reduziu 80,35% da atividade das PPOs do suco de yacon refrigerado e o LBA reduziu 79,40% e 48 h de refrigeração;

d) As propriedades investigadas do ácido málico demonstraram em sua maioria resultados superiores às do LBA. Porém o LBA se destacou quanto ao comportamento reológico e de retenção em água de géis de pectina e confirmou mais uma vez sua importância para a indústria de alimentos;

e) O LBA apresentou efetividade como acidulante, conservante, quelante de cálcio e ferro, antioxidante, e permitiu a estabilidade dos parâmetros de cor do suco de yacon durante 120 dias de armazenamento refrigerado, porém sem efeito significativo como ingrediente prebiótico. Sendo que, a amostra Controle apresentou vida útil de 60 dias, e o LBA e também o ácido málico permitiram dobrar a vida útil do suco de yacon;

f) O suco de yacon conseguiu manter seu potencial prebiótico durante 120 dias de refrigeração, considerando o desenvolvimento das espécies probióticas *Lactobacillus* e durante 105 dias para o *B. animalis* subsp. *lactis*;

g) Perfil Flash, E-nose e sensometria mostraram-se úteis para diferenciar as amostras de suco de yacon, com e sem ácidos e analisar os descritores mais bem correlacionados com cada uma. O suco com ácido lactobionico mostrou grande semelhança ao suco de yacon com ácido tartárico, quanto aos sinais obtidos dos compostos voláteis. Sendo assim os descritores do perfil sensorial do SY-T também descreveriam o SY-L: Flavor de ervas, de soja, de cereal e folhas, e de amido.

Perspectivas

Com tudo que foi aqui determinado e exposto como resultado, outras proporções de adição de ácido devem ser ainda mais avaliadas, bem como outros ingredientes que possam melhorar a intenção de compra do suco yacon, ou mascarar/agir em sinergia com ácidos, sem alterar a estabilidade, qualidade e segurança deste novo produto.

O potencial deste suco é grande, como foi demonstrado, e por seu sabor suave poderia ser estudado e utilizado assim como o suco de maçã é utilizado, como base para tantas outras formulações. Além disso, a semelhança entre as amostras controle das adicionadas de ácido, mesmo que não esperada dizem muito sobre a visão de alimento, que vem se modificando. Há aspectos culturais, educacionais, informativos e emocionais, e até mesmo o suco de yacon sem nenhuma acidificação, pode ser considerado um produto comercial em potencial.

Lactobionic Acid as a Potential Food Ingredient: Recent Studies and Applications

Taís Cardoso , Caroline Marques , João Luiz Andreotti Dagostin , and Maria Lúcia Masson 

Abstract: Lactobionic acid (LBA) is a bionic acid naturally found in the “Caspian Sea yogurt” and chemically constituted of a gluconic acid bonded to a galactose. The compound is known for its numerous proven attributes as an antioxidant, chelator, and moisturizer agent. There is a growing interest of the academic community and industry research sectors in the application of LBA as a food ingredient. Thus, this review describes the current methods of LBA production, patents related, general applications and regulations, research statistics, future prospects, and an overview of the challenges faced by the food industry to incorporate the acid in their products. Studies associated to food application and human intake are scarce in the literature. To date, they account for only a small amount of all available research papers and patents on the subject, which is due to LBA prohibitions despite the approval of its salt (calcium lactobionate) and the lack of regulation in most countries. Further studies on the safety of consumption should be carried out in coming years in order to elucidate its toxicological aspects and to extend the technological possibilities of the food processing industry.

Keywords: chelator, dairy, lactose, moisturizer, organic acid, prebiotic

Introduction

Lactose derivatives are compounds obtained by the transformation of the referred carbohydrate by using proper technologies. Lactulose, galactooligosaccharides, and lactobionic acid (LBA) are those of higher representativeness. All these compounds are known for their prebiotic effects, which means that after ingestion they remain intact until they reach the large intestine, where fermentation is driven by the colonizing microbiota (Alonso, Rendueles, & Díaz, 2013; Gänzle, Haase, & Jelen, 2008; Schaafsma, 2008). Among them, LBA is classified as a bionic acid, rarely found in nature, which is a white powder in the crystallized form. Consisting of a polyhydroxy gluconic acid, bonded to galactose sugar ($C_{12}H_{22}O_{12}$), the LBA is most known for its antioxidant, antimicrobial, chelating, stabilizer, acidulant, and moisturizing properties nowadays (Alonso et al., 2013; Illanes et al., 2016). The properties of LBA are in the process of emerging research, in order to prove their potential use.

At this moment, most of the studies found in the literature focuses on methods of obtaining LBA and process optimization. Despite the existence of a few studies on food application and human intake of LBA, conclusive data are still very scarce. As a consequence of this limited knowledge, most of global food and health agencies limit its application. As more studies on the subjected arise, it becomes eminent the need of assessing the safe intake levels of LBA by humans in the upcoming years. Mainly due to the potential food applications, fast development and innovations of the technology, this work aims to provide a review about the LBA. The review approaches the obtaining methods, close view of the current patents, application as a food ingredient, future prospects, focusing in recent specific applications extending the ongoing information about the food industry.

Lactobionic Acid

The biochemical nomenclature given to the LBA is 4-O- β -galactopyranosyl-D-gluconic acid (CAS No 96-82-2, PubChem CID 7314). Chemically, LBA is composed of a galactose moiety bonded to a gluconic acid molecule through an ether-like linkage. Its chemical structure is represented in the Figure 1, where several hydroxyls are evidenced. These functional groups are primarily responsible for the intermolecular forces. When in solution LBA is highly soluble in water and poorly soluble in organic solvents such as ethanol, glacial acetic acid and methanol (Gutiérrez, Hamoudi, & Belkacemi, 2012).

It is possible to identify the reducing part of a disaccharide divided in two similar sugars, the aldonic acid and the aldose (Pigman, Wolfrom, & Peat, 1948). Some chemical properties established according to the Pharamanostra (2017) analysis certificate (July 24, 2017), are summarized in Table 1, showing its acidification power and the appropriate water solubility, properties that make LBA a potential food ingredient, since most of the foods have high aqueous contents.

Methods of Production

The classical method for obtaining LBA dates from the 1930s, where Isbell (1933) obtained the compound by a chemical electrolytic method using lactose. Since then, new methods and techniques for obtaining LBA have become objects of study in upcoming studies (Gutiérrez et al., 2012), as the most recent electrochemical process (Kokoh & Alonso-Vante, 2006), the enzymatic method (Lin, Hu, Inukal, & Tsai, 1993), the biocatalytic-microbial source (Stodola & Lockwood, 1947), the catalytic hydrogenation, and heterogeneous catalytic oxidation (Glattfeld & Schimpff, 1935; Kuusisto et al., 2006, 2007).

Most recent studies focus on biotechnological processes to obtain LBA (microbial enzymatic routes), which are extremely promising systems concerning the cost and benefit factors. However, like most biological systems, these methods still need to be improved so they overcome the inherent barriers to the process and achieve efficiency (Alonso et al., 2013; Gupta, Treichel, Shapaval, Tuohy, & Oliveira, 2017; Miyamoto, Ooi, & Kinoshita,

Received: 17 July 2019 | Revised: 19 August 2019 | Accepted: 15 September 2019

DOI: 10.1111/jfpe.13277

ORIGINAL ARTICLE

Journal of
Food Process Engineering

WILEY

Characterization of lactobionic acid evidencing its potential for food industry application

Taís Cardoso¹ | Caroline Marques¹ | Anne Raquel Sotiles² |
João Luiz Andreotti Dagostin¹ | Maria Lucia Masson¹

¹Department of Chemical Engineering,
Graduate Program in Food Engineering,
Federal University of Paraná, Curitiba, Puerto
Rico, Brazil

²Department of Chemistry, Graduate Program
in Chemistry, Federal University of Paraná,
Curitiba, Puerto Rico, Brazil

Correspondence

Taís Cardoso, Department of Chemical
Engineering, Graduate Program in Food
Engineering, Federal University of Paraná,
Av. Francisco Heráclito dos Santos s.n.,
81530-900 Curitiba, PR, Brazil.
Email: taiscardoso33@gmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior, Grant/Award Number:
1700001

Abstract

The chemical configuration of the lactobionic acid (LBA) evidences its potential properties, among which the antioxidant, antimicrobial, and chelating activities stand out in the literature. However, few studies aim at testing and confirming them. The purpose of this study was to determine some selected LBA properties, whose characteristics are of interest for its use as an ingredient in foodstuffs. The discussion followed the results of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-ray diffractometry (XRD), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical, thermogravimetric/derivative thermogravimetry (TGA/DTG), minimal inhibitory concentration (MIC) by the diffusion disk test, scanning electron microscopy (SEM), and iron/calcium chelating methodologies. The XRD analysis revealed the presence of an amorphous halo and the absence of defined peaks, a fact possibly related to its high hygroscopicity. The FTIR showed characteristic bands of the LBA structure. Results from TGA/DG verified the LBA thermal degradation, which evidenced that LBA could participate in most food industry unit processes within the first mass loss event. Antioxidant capacity reached a maximum inhibition of 56% for LBA and the chelating capacity of the iron ion achieved 54% of chelated ions, while the calcium ions reached 15%. The results revealed high potential of LBA application for microbial inhibition, moisture retention, and texture maintenance throughout storage of food products.

Practical Applications

Despite the potential of application of the LBA, few quantitative results demonstrate its ability of action in food. Even without permission in most countries around the world, more research with LBA will encourage the investigation of its toxicology, expanding the areas of application. Its thermal degradation profile and elevated solubility demonstrated the potential of LBA as food ingredient, performing moreover as antioxidant, chelating agent, antimicrobial, and texturizer. The results open the possibilities for many applications in the field of food chemistry and food industry.

1 | INTRODUCTION

Lactobionic acid (LBA) is an aldobionic acid whose chemical structure consists of gluconic acid bonded to galactose, with nine free hydroxyl

groups. This configuration provides the LBA with some potential properties such as antioxidant, antimicrobial, moisturizing, and chelating (Alonso, Rendueles, & Díaz, 2013; Illanes et al., 2016; Saha, Sasmal, Alam, & Das, 2014). Among these, the antioxidant and



Contents lists available at ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: www.elsevier.com/locate/infset

Lactobionic acid as a suitable food preservative for yacon juice

Caroline Marques^{a,*}, José Pedro Wojciechowski^a, Taís Cardoso^a, Marcos R. Mafra^a,
Marina Leite Mitterer-Dalton^b, Maria Lucia Masson^a^a Department of Chemical Engineering, Graduate Program in Food Engineering (PPGEAL), Federal University of Paraná, Av. Francisco Heráclito dos Santos, 100, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil^b Department of Chemistry, Graduate Program in Chemical and Biochemical Technology Processes (PPGTP), Federal University of Technology, Km 01, 85503-390 Pato Branco, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Smallanthus sonchifolius
 Enzyme kinetics
 Polyphenol oxidases
 Refrigerated storage
 Antioxidants
 Color

ABSTRACT

Yacon root is known for its antioxidant, prebiotic and insulin modulator benefits. However, like the root, yacon juice exhibits rapid enzymatic browning, requiring treatments such as acidification. Lactobionic acid (LBA) is a promising food ingredient, which contains not only preservative but also nutritional properties. The first goal of this study was to evaluate the influence of combined treatments (blanching, acid pretreatment) and LBA on refrigerated yacon juice (8 °C; 48 h). The analysis of pH, antioxidants, total polyphenols and color, were used to select the optimal combined conditions, which were steam blanching (10 min) + LBA 1%. Secondly, the LBA was compared with citric, malic, tartaric, and ascorbic acids (at 1% levels), where the kinetics of polyphenol oxidases were determined in refrigerated storage of the juice at 8 °C for 48 h. Results showed that LBA, malic and tartaric acids maintained the color of yacon juice and preserved bioactive compounds. LBA and malic acid prevented enzymatic browning with PPO reductions of 80.4% and 79.4%, respectively. This was the first time that LBA has been tested in a refrigerated juice showing significant potential for preservation of color and bioactive compounds in food products.

1. Introduction

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a plant with tuberous roots, of Andean origin and common recurrence in South America. It received the title of functional food mainly due to its fructan components (fructooligosaccharides (FOS) and inulin) and phenolic compounds (Ojansivu, Ferreira, & Salminen, 2011). Studies indicate that the compounds present in yacon modulate insulin production, aiding insulin-resistant patients with type 2 diabetes (Delgado, Thomé, Gabriel, Tamashiro, & Pastore, 2012; Dionísio, de Carvalho-Silva, Vieira, & Goes, T. de S., Wurlitzer, N. J., Borges, M. de F., Brito, E. S. de, Ionta, M., & Figueiredo, R. W. de., 2015), besides presenting prebiotic (Campos et al., 2012) and antioxidant activities in its roots, leaves and flowers (Castro, Caballero, Herbas, & Carballo, 2012).

As a consequence of all the studies carried out to date, yacon has been attracting world attention to its benefits (Delgado et al., 2012), as

consumers are increasingly interested in products that offer health benefits beyond the nutritional ones. Nevertheless, the yacon fresh roots are highly perishable and susceptible to a fast browning during its processing, attributable to its high polyphenoloxidase activity (Neves & Da Silva, 2007).

Neves and Da Silva (2007) described the mechanisms of oxidation through the PPO activity in yacon roots. According to them, it begins with the oxidation of phenolic compounds into highly unstable o-quinones, further polymerized to dark pigments and the whole reaction depends on the root's composition, oxygen availability, metallic ions, pH, temperature, and the activity of the PPOs involved. An alternative to preserve yacon properties and benefits is the elaboration of derivatives (Castro et al., 2012).

The most studied yacon derivatives are the flour (Sousa et al., 2015; Sousa et al., 2015), the dried chips (Castro et al., 2012), leaves and flower extracts (Andrade, de Souza Leone, Ellendersen, & Masson,

Abbreviations: AA, Ascorbic acid; ABTS, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); CA, Citric acid; DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; FOS, Fructooligosaccharides; FO, First-order; HCA, Hierarchical clustering analysis; LBA, Lactobionic acid; MA, Malic acid; PPOs, Polyphenol oxidases; PT, Pretreatment; PLS, Partial Least Squares; PCA, Principal component analysis; RMSEC, Root mean square error of calibration; RMSECV, Root mean square error of cross validation; RMSE, Root mean square error; TA, Tartaric acid; TP, Total polyphenols; ZO, Zero-order

* Corresponding author.

E-mail addresses: caroolmarques@gmail.com (C. Marques), jose.pedro@ufpr.br (J.P. Wojciechowski), marcos.mafra@ufpr.br (M.R. Mafra), marinadalton@utfpr.edu.br (M.L. Mitterer-Dalton), masson@ufpr.br (M.L. Masson).

<https://doi.org/10.1016/j.infset.2020.102400>

Received 11 January 2020; Received in revised form 15 May 2020; Accepted 18 May 2020

Available online 23 May 2020

1466-8564/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Long-term storage of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice: Phytochemical profile, *in vitro* prebiotic potential and discriminant bioactive properties

Caroline Marques^{a,*}, Carlos Eduardo Bortolan Toazza^a, Rafael Sari^c,
Marina Leite Mitterer-Daltoé^b, Wanderlei do Amaral^a, Maria Lucia Masson^a

^a Department of Chemical Engineering, Graduate Program in Food Engineering (PPGEAL), Federal University of Paraná, Av. Francisco Heráclito dos Santos, n. 100, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil

^b Department of Chemistry, Graduate Program in Chemical and Biochemical Technology Processes (PPGTP), Federal University of Technology, Km 01, 85503-390, Pato Branco, PR, Brazil

^c Department of Chemistry, Graduate Program in Chemistry, Federal University of Paraná, Av. Francisco Heráclito dos Santos, n. 100, 81530-900, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bifidobacteria
Functional food
Lactobacillus
Lactobionic acid
Product development
Shelf life

ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a plant, with South American origin, whose roots received the designation of functional food due to fructan-type sugars and phenolics in its composition. Aiming to keep yacon beneficial compounds in long-term storage, a new food formulation was proposed, being prebiotic yacon juice preserved by lactobionic (LBA) and malic acids. Thus, yacon juice was evaluated regarding its prebiotic potential *in vitro*, bioavailability of phenolic compounds and bioconversion of sugars. Discriminant analysis with canonical correlation pointed out Fe²⁺ chelation, color, pH, total extractable polyphenols and prebiotic potential as the discriminating parameters among samples, during refrigerated storage of 120 days (6 °C ± 2 °C). The essential role of LBA and malic acid addition was confirmed as they kept: pH at desirable levels, a stable color profile, Fe²⁺ chelating activity at values between 30-40% until day 30, bioavailability of polyphenols up to 13% maximum loss, and almost doubled the shelf-life. Chromatographic profile by HPLC corroborated these findings, which verified a more solid hydrolysis of fructan-type sugars in the yacon juice without acids. Resultant molds and yeasts limited the shelf-life to 60 days for the control sample, and 105 days for the acid-added ones. In addition, unprecedented prebiotic potential of yacon juice was confirmed: to *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* for at least 120 days and for 105 days for *Bifidobacterium animalis*. Lastly, the LBA, an alleged prebiotic compound, had no prebiotic-enhancing activity, possibly due to the amount (1%) applied.

1. Introduction

Prebiotics are complex food compounds not digested by human metabolism. They can reach the bowel where beneficial strains of microorganisms selectively ferment it. Some benefits associated with prebiotics are: Microbiota modulation, higher calcium and magnesium absorption, anti-carcinogenic activity, superior intestinal transit, lower cholesterol and triglyceride serum levels (Caetano et al., 2016; Faber-sani et al., 2018).

In this scenario, there are yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots, originating from a Latin American plant, which commonly occurs in South America. They provide carbohydrates for a low caloric diet and can have several derivatives. Traditionally consumed fresh by the

Andean people, due to its succulence, sweetish flavor and relatively low caloric value, it can be used as an ingredient in formulations such as jellies, baked products, and syrups, especially in products for diabetics. These roots received the designation of functional food drawing worldwide attention. Yacon roots are a prebiotic source with a history of safe use, which store fructan components (fructooligosaccharides – FOS – and inulin), instead of starch, and exhibit phenolic compounds known for promoting health benefits (Pedreschi, Campos, Noratto, Chirinos, & Cisneros-Zevallos, 2003).

The prebiotic fructooligosaccharides content of yacon makes this root an attractive alternative for the production and supplementation of several food products. The preservation of yacon compounds and properties through product development has been proposed as an

* Corresponding author.

E-mail addresses: caroolmarques@gmail.com (C. Marques), carlostoazza@gmail.com (C.E. Bortolan Toazza), rafael.mazzonetto@gmail.com (R. Sari), marinadaltoe@utfpr.edu.br (M.L. Mitterer-Daltoé), wdoamaral@hotmail.com (W. Amaral), masson@ufpr.br (M.L. Masson).

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100970>

Received 10 January 2021; Received in revised form 11 February 2021; Accepted 7 March 2021

Available online 11 March 2021

2212-4292/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Yacon-based Beverage as Non-dairy Vehicle for *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*: Stability and *In vitro* Probiotic Viability

Felipe M. F. Watanabe¹, Caroline Marques^{1,*} , Fabiane O. Farias¹ , Luciana N. Ellendersen¹ , Maria Lucia Masson¹ 

¹ Postgraduate Program of Food Engineering from Federal University of Paraná. Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 210, Zip Code 81531-970; felipefarian@hotmai.com (F.M.F.W.); caroolmarques@gmail.com (C.M.); fa.ofarias@gmail.com (F.O.F.); lucianalsn@gmail.com (L.N.E.); masson@ufpr.br (M.L.M.);

* Correspondence: caroolmarques@gmail.com;

Scopus Author ID 57188685188

Received: 21.11.2020; Revised: 7.12.2020; Accepted: 9.12.2020; Published: 11.12.2020

Abstract: Probiotics are health-promoting microorganisms commonly applied to functional foods. Dairy products are the most common source of probiotics, which difficult probiotics' consumption by lactose intolerants. In this work, a yacon-based (*Smallanthus sonchifolius*) beverage was evaluated as a non-dairy vehicle for probiotics (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12®), concerning stability and probiotics viability, during 28 days. The yacon-based beverage was properly obtained. To determine the better treatment to stabilize it during storage, combined treatments were optimized via experimental design, and the color stability evaluated the initial changes. The beverage was incubated with the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* and the fermentation were carried out at 45 °C and 35 °C for 10 h in anaerobic jars. The storage viability was evaluated for 28 days, and the viable cell counting was carried out every seven days. A combination of the immersion of yacon slices into ascorbic acid 0.5% (w/v), blanching (3 min), and the addition of 0.4% (w/v) of ascorbic acid as an antioxidant was the most promising treatment to maintain color stability. Moreover, the fermentation applying 35 °C maintained the beverage with probiotic status for 14 days. In this work, a probiotic beverage was proposed, with potential health benefits, based on an underused root with great productivity, which will result in a potential low-cost probiotic product compared to dairy-based probiotic beverages.

Keywords: fermentation; probiotics; food preservation; food processing; bifidobacteria; beverages.

© 2020 by the authors. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The food industry has been investing in functional foods that provide nutrition and improve health and life quality. Among the functional foods classes, it can be mentioned the probiotic, prebiotic, and synbiotic foods. Probiotic food comprises more than 60% of the functional food market worldwide. It is forecast to reach a market value of \$69.3 billion by 2023 [1]. Presently, there is an upsurge in the consumption of fruit juices and beverages, especially the functional ones with probiotic bacteria [2–4].

Probiotics are microorganisms that enhance human metabolism when ingested in a sufficient number and colonize the gastrointestinal tract [2]. Some benefits are associated with probiotics as an anti-carcinogenic activity, vitamin production, higher lactose digestion, and



ORIGINAL ARTICLE

Full physicochemical characterization of malic acid: Emphasis in the potential as food ingredient and application in pectin gels

Caroline Marques^{a,c,*}, Anne Raquel Sotiles^{b,c}, Fabiane Oliveira Farias^a, Grazielle Oliveira^a, Marina Leite Mitterer-Daltoé^c, Maria Lucia Masson^a

^a Department of Chemical Engineering, Graduate Program in Food Engineering, Federal University of Paraná, Av. Francisco Heráclito dos Santos, n. 100, PC 81531-980 Curitiba, Parana State, Brazil

^b Department of Chemistry, Graduate Program in Chemistry, Federal University of Paraná, Av. Francisco Heráclito dos Santos, n. 100, PC 81530-900 Curitiba, Parana State, Brazil

^c Department of Chemistry, Graduate Program in Chemical and Biochemical Technology Processes, Federal University of Technology – Parana, Km 01, PC 85503-390 Pato Branco, Parana State, Brazil

Received 13 September 2020; accepted 25 October 2020

KEYWORDS

Malic acid;
Food processing;
Food preservative;
Metal chelating;
Antibacterial agent;
Pectin gels

Abstract Malic acid, a carboxylic acid most found in fruits, is a smooth taste substance used as flavoring and preservative agent in foods, although not as used as citric acid. There are no studies focusing in quantitative results or investigations on its physicochemical properties, useful to the food industry, or even the confirmation of its calcium chelating, buffer texturizer and antioxidant alleged properties. Thus, the aim of this work was the assessment of most physicochemical properties of malic acid, solid and in solution, that could be useful to the food industry understand its real potential. The following analyses were carried out: melting point; structure (NMR, XRD, FTIR and SEM/EDS); TGA/DTG; solubility, hygroscopicity; antioxidant activity, iron chelating and antibacterial activities and stability of pectin gels. The melting temperature found was 129.71 °C. TGA/DTG exhibited first loss of mass around 140 °C. In the temperature range of 10 to 55 °C, it exhibited a high solubility in water, from 48.12 to 61.49 (100w), respectively. The tested bacteria, related to food spoilage, were inhibited by DL-malic acid 10% or higher. Chelating and antioxidant activities showed expressive results even in 1% solution. Pectin gels with malic acid had stronger structure and less syneresis than citric acid gels. In addition, calcium chelating, buffer texturizer and antioxidant properties were confirmed. Thus, malic acid has potential to be applied in a wide

* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering, Graduate Program in Food Engineering, Federal University of Paraná, Av. Francisco Heráclito dos Santos, n. 100, PC 81531-980 Curitiba, Parana State, Brazil.

E-mail address: caroolmarques@gmail.com (C. Marques).

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.10.036>

1878-5352 © 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Effect of processing methods on yacon roots health-promoting compounds and related properties

Felipe Richter Reis ^a , Caroline Marques ^b, Ana Carolina Sales de Moraes ^b, Maria Lucia Masson ^b

[Show more](#)

Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.010>

[Get rights and content](#)

Highlights

- Yacon roots contain high amounts of prebiotic inulin-type fructans and rare phenolics.
- The best fructan retention is achieved by drying preceded by blanching with salts and acids.
- The highest phenolic content in solids is achieved by spray drying.
- The highest phenolic content in liquids is achieved by blanching combined with acid addition.
- The yacon-based products with best health-promoting properties are flours.

CAPÍTULO 9 – Referências e Apêndices

9.1 REFERÊNCIAS

- ADEBOLA, O. O.; CORCORAN, O.; MORGAN, W. A. Synbiotics: The impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 75–84, 2014.
- AFFERTSHOLT, T. **Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives**. Presentation at IDF Symposium Lactose and its derivatives. **Anais...**2007. Disponível em: <http://lactose.ru/present/1Tage_Affertsholt-Allen.pdf>
- AGTE, V. et al. Prebiotic potential of 'juice grape' varieties and some hybrids. v. 69, p. 850–854, 2010.
- AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 1, p. 27–37, jul. 2008.
- AKARANTA, O.; AKAHO, A. A. Synergic Effect of Citric Acid and Peanut Skin Extract on the Oxidative Stability of Vegetable Oil. v. 16, n. 4, p. 345–351, 2012.
- ALAKOLANGA, A. G. A. W. et al. Antioxidant property and α -amylase and lipase inhibiting activities of Flacourtia inermis fruits: characterization of malic acid as an inhibitor of the enzymes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 8383–8388, dez. 2015.
- ALBERT, A. et al. Overcoming the issues in the sensory description of hot served food with a complex texture. Application of QDA®, flash profiling and projective mapping using panels with different degrees of training. **Food Quality and Preference**, v. 22, n. 5, p. 463–473, jul. 2011.
- ALLEN, K. E. Metal chelators as antioxidants for food preservation. In: **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 79–104.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Efficient lactobionic acid production from whey by Pseudomonas taetrolens under pH-shift conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9730–9736, 2011.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1275–1291, 2013.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by Pseudomonas taetrolens. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 314–323, 2015.
- ANESE, M. et al. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities. **Journal of Food Biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 285–293, ago. 1994.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 18th. ed. Gaithersburg: Official Methods, 2005.
- APAK, R. et al. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 10 fev. 2016.
- ARORA, S. K. et al. Determination of relationship between sensory viscosity rating and instrumental flow behaviour of soluble dietary fibers. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 4, p. 2067–2076, abr. 2016.
- ARTHUR, S.; WALTER, K. **Oxidation of aldoses**, 1927. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US1703755A/>>

- ARVANITOYANNIS, I. S.; TSITSIKA, E. V.; PANAGIOTAKI, P. Implementation of quality control methods (physico-chemical, microbiological and sensory) in conjunction with multivariate analysis towards fish authenticity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 237–263, mar. 2005.
- BAKERPEDIA. **Malic acid** Bakerpedia, 2020. Disponível em: <<https://bakerpedia.com/ingredients/malic-acid/>>. Acesso em: 21 jan. 2020
- BALDWIN, C. et al. **Mineral complexes of lactobionic acid and method of using for mineral fortification of food products**, 2010. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US20070026110>>
- BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (EDS.). **Encyclopedia of food microbiology**. 2. ed ed. Amsterdam: AP, Academic Press/Elsevier, 2014.
- BISINELLA, R. Z. B. et al. Some instrumental methods applied in food chemistry to characterise lactulose and lactobionic acid. **Food Chemistry**, v. 220, p. 295–298, 2017.
- BONA, E. Enose CAD. Brazilian Patent BR512018001472-0. Brazil: Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2018.
- BORDIM, J. et al. Potential use of naturally colored antioxidants in the food industry—A study of consumers' perception and acceptance. **Journal of Sensory Studies**, 17 abr. 2021.
- BOTELHO, G. et al. Methanol in Grape Derived, Fruit and Honey Spirits: A Critical Review on Source, Quality Control, and Legal Limits. **Processes**, v. 8, n. 12, p. 1609, 7 dez. 2020.
- BRANDÃO, C. C. et al. Study of the aging of fermented of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and sensory profile and acceptance. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 2, p. 332–340, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; Berset, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity** LWT - Food Science and Technology, 1995.
- BRASIL. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. In: **RDC Nº 12 DE 2 DE JANEIRO DE 2001**. Brasília, DF: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2001.
- BRASIL, 2010. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). In: [s.l: s.n.].
- BRASIL, 2018. Parâmetros analíticos de suco e de polpa de frutas. In: **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 1º DE OUTUBRO DE 2018**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2018.
- BUTLER, G.; RIVERA, D. **Innovations in Peeling Technology for Yacon**, 2004.
- BÜYÜKBALCI, A.; EL, S. N. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 27–33, 2008.
- CALAPINI, S.; VALENCIA, D.; DEE, K. **Calcium fortified acidic beverages**, 2002. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20040101597>>. Acesso em: 23 jan. 2020
- CALDERÓN, O. et al. Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations. v. 57, n. 1, 2001.
- 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, n. 3, p. 1592–1599, 2012.
- CARDOSO, T. et al. Lactobionic Acid as a Potential Food Ingredient: Recent Studies and Applications. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 7, p. 1672–1681, jul. 2019a.

CARDOSO, T. et al. Characterization of lactobionic acid evidencing its potential for food industry application. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 7, nov. 2019b.

CAYMAN CHEMICAL, C. **SAFETY DATA SHEET - Lactobionic Acid**. Ann Arbor. 2014.

CBI. **Market information - Exporting yacón to Europe**. 2016. Disponível em: <<https://www.cbi.eu/market-information/honey-sweeteners/yacon/>>. Acesso em: 1 jan. 2018.

CEASA RJ. **Daily quotation of food**, 2019. Disponível em: <http://www.ceasa.rj.gov.br/ceasa_portal/view/Listar_Cotacoes.asp>

CHEMLER, J. A. et al. Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 4, p. 797–807, 2007.

CHEN, H.; ZHONG, Q. Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 260, n. August, p. 36–41, 2017.

CHISARI, M.; BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G. Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase and Influence on Browning of Cold Stored Strawberry Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3469–3476, maio 2007.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. In: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

CONTADO, E. W. N. F. et al. Emprego da farinha e do extrato de frutanos de yacón na elaboração de apesuntados. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 49–56, 2015.

CORREDIG, M. **Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses**. [s.l.] Elsevier Science, 2009.

CORTÉS, C. et al. Carotenoid Profile Modification during Refrigerated Storage in Untreated and Pasteurized Orange Juice and Orange Juice Treated with High-Intensity Pulsed Electric Fields. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6247–6254, ago. 2006.

CUEVA, C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, jun. 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition**. [s.l.] CRC Press, 2007.

DE LIMA MENDES, A. H. et al. Sensory acceptance and characterization of yoghurt supplemented with yacón syrup and cashew apple extract as a source of bioactive compounds. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–11, 2019.

DEL CASTILLO, V. C.; GOLDNER, M. C.; ARMADA, M. Evaluation of Texture Profile, Color and Determination of FOS in Yacón Products (*Smallanthus sonchifolius*). **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 4, n. 7, p. 540, 2016.

DELGADO, G. T. C. et al. Yacón (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. **Nutrition Research**, v. 32, n. 11, p. 884–892, 2012.

DELGADO, G. T. C. et al. Yacón (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 3, p. 222–228, 2013.

DEMIATE, I. M.; OETTERER, M.; WOSIACKI, G. Characterization of chestnut (*Castanea sativa*, mill) starch for industrial utilization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 69–78, mar. 2001.

DIONÍSIO, A. P. et al. Desenvolvimento de Bebida Prebiótica de Caju e Yacón. v. 82, p. 21, 2013.

- DIONÍSIO, A. P. et al. Cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) functional beverage improve the diabetic state in rats. **Food Research International**, v. 77, p. 171–176, 2015a.
- DIONÍSIO, A. P. et al. Processamento e estabilidade de uma bebida de caju e yacon durante o armazenamento sob refrigeração. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 0, p. 1–7, 2017.
- DOKKUM, VAN W. et al. The tolerance of lactobionic acid in Man. **TNO Nutrition and Food Research**, v. 95, n. 115, p. 1–22, 1994.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: PUCpress, 2013.
- EUROPEAN COMMISSION. **Comission staff working document**. 2017.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Scientific Opinion on the safety and efficacy of malic acid and a mixture of sodium and calcium malate when used as technological additives for all animal species**. [s.l.] European Food Safety Authority, 2014.
- FAO. Technical Meeting on Prebiotics - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO – FAO. . 2008, p. 1–12.
- FDA. Title 21-Food And Drugs. Chapter I-Food And Drug Administration. Department Of Health And Human Services. Subchapter B-Food For Human Consumption (Continued). Part 184 - Direct Food Substances Affirmed As Generally Recognized As Safe (GRAS). Subpart B-Listing of Specific Substances Affirmed as GRAS. Sec. 184.1069 Malic acid. In: 21CFR184.1069 ed..
- FERRER-GALLEGO, R. et al. Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas. **Food Research International**, v. 62, p. 1100–1107, ago. 2014.
- FRANCO, T. S. et al. Foam mat drying of yacon juice: Experimental analysis and computer simulation. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 48–57, 2015.
- FRANCO, T. S. et al. Effects of foam mat drying on physicochemical and microstructural properties of yacon juice powder. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 503–513, 2016.
- GALVAN, D. et al. Calibration Transfer of Partial Least Squares Regression Models between Desktop Nuclear Magnetic Resonance Spectrometers. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 19, p. 12809–12816, 6 out. 2020.
- GARCÍA, C.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Synbiotic Fermentation for the Co-Production of Lactic and Lactobionic Acids from Residual Dairy Whey. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 5, p. 1250–1256, 2017.
- GARCIA-TORCHELSEN, L. et al. Caracterização do odor da anchoita (*Engraulis anchoita*) armazenada em gelo e água do mar. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 3, p. 249–257, 2009.
- GENTA, S. B. et al. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 11, p. 1657–1665, 2005.
- GENTA, S. B. et al. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 182–187, 2009.
- GENTA, S. B. et al. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: Constituents of the most active fractions. **Chemico-Biological Interactions**, v. 185, n. 2, p. 143–152, 2010.
- GERMEC, M.; TURHAN, I. Ethanol production from acid-pretreated and detoxified tea processing waste and its modeling. **Fuel**, v. 231, p. 101–109, nov. 2018.
- GLIBOWSKI, P.; SKRZYPCZAK, K. Prebiotic and Synbiotic Foods. In: **Microbial Production of Food Ingredients and Additives**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 155–188.

GODERSKA, K.; SZWENGIEL, A.; CZARNECKI, Z. The utilization of *Pseudomonas taetrolens* to produce lactobionic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 8, p. 2189–2197, 2014.

GONÇALVES, I. F. et al. Efeito de yacon na aceitação sensorial de kefir e viabilidade de bactérias lácticas na bebida. **Revista Vértices**, v. 20, n. 2, p. 194–201, 2018.

GOOGLE PATENTS, S. Pesquisa: **Lactobionic acid**. [2018].

GOOGLE PATENTS, S. Pesquisa: **Yacon and yacon products**. [2019].

GRAEFE, S. et al. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**, v. 86, n. 2–3, p. 157–165, 2004.

GRANATO, D. et al. Influence of passion fruit juice on colour stability and sensory acceptability of non-sugar Yacon-based pastes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 149–159, 2011.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2–3, p. 213–220, 16 jan. 2006.

GUO, X. et al. Characteristics of Two Calcium Pectinates Prepared from Citrus Pectin Using Either Calcium Chloride or Calcium Hydroxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 27, p. 6354–6361, 9 jul. 2014.

GUPTA, V. K. et al. **Microbial Functional Foods and Nutraceuticals**. [s.l.] Wiley, 2017.

GUTIÉRREZ, L. F. et al. Production of lactobionic acid by means of a process comprising the catalytic oxidation of lactose and bipolar membrane electrodialysis. **Separation and Purification Technology**, v. 109, p. 23–32, 2013.

HAASE, N. U. The formation of acrylamide in potato products. In: **Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 41–59.

HABIB, N. C. et al. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. **Chemico-Biological Interactions**, v. 194, n. 1, p. 31–39, 2011.

HADDI, Z. et al. E-Nose and e-Tongue combination for improved recognition of fruit juice samples. **Food Chemistry**, v. 150, p. 246–253, 2014.

HALAMA, R.; KOTALA, T.; VRÁNA, J. Modification of the organoleptic properties of beverages. **Desalination and Water Treatment**, v. 56, n. 12, p. 3181–3190, 2015.

HALSEY, G. Physical adsorption on uniform surfaces. v. 16, n. 10, p. 931–937, 1985.

HISADA, Y.; NAWATA, N.; NAWATA, Y. H. N. **Yacon and food and drink prepared therefrom**, 1992. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/JPH0475569A/en?q=yacon+in+food&sort=old>
<https://patents.google.com/patent/JPH0475569A/en?q=yacon&sort=old&clustered=false>>

HONDO, M. et al. Effects of activated carbon powder treatment on clarification, decolorization, deodorization and fructooligosaccharide content of yacon juice. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 47, n. 2, p. 148–154, 2000.

HONDO, M.; OKUMURA, Y.; YAMAKI, T. A Preparation Method of Yacon Vinegar Containing Natural Fructooligosaccharides. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 47, n. 10, p. 803–807, 2000.

HUI, Y. H. **Handbook of food science, technology, and engineering**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.

ILLANES, A. et al. **Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective**. [s.l.] Elsevier Science, 2016.

ISELL, H. S. PREPARATION OF CALCIUM LACTOBIONATE AND LACTOBIONIC a-LACTONE. **Bureau of Standards Journal of Research**, v. 11, p. 713–717, 1933.

- ISMAIL, H. A. et al. Effect of Antioxidant Application Methods on the Color, Lipid Oxidation, and Volatiles of Irradiated Ground Beef. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. C25–C32, jan. 2009.
- ISO 3972. Sensory analysis — Methodology — Method of investigating sensitivity of taste. In: **ISO 3972:2011**. 1. ed. New York: ANSI, 2011. p. 10.
- ISO 5496. Sensory analysis — Methodology — Initiation and training of avaluadors in the detection and recognition of odours. In: **ISO 5496:2006**. 1. ed. New York: ANSI, 2006. p. 16.
- ISO 13299. Sensory analysis — Methodology — General guidance for establishing a sensory profile. In: **ISO 13299:2016**. 1. ed. New York: ANSI, 2016. p. 41.
- ISO 16820. Sensory analysis - Methodology - Sequential analysis. In: **ISO 16820:2004**. 1. ed. New York: ANSI, 2004. p. 10.
- JACKSON, R. S. Fermentation. In: **Wine Science**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 332–417.
- KALSCHNE, D. L. et al. Sensory characterization and acceptance of coffee brews of *C. arabica* and *C. canephora* blended with steamed defective coffee. **Food Research International**, mar. 2018.
- KEYKHOSRAVI, K.; JEBELLI JAVAN, A.; PARSAIEMEHR, M. Effect of malic acid on bioactive components and antioxidant properties of sliced button mushroom (*Agaricus bisporus*) during storage. **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, n. 4, jan. 2016.
- KIRYU, T. et al. Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt ("Caspian Sea yogurt") in Japan. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 25–34, 2009.
- KÖNIG, L. M.; RENNER, B. Colourful = healthy? Exploring meal colour variety and its relation to food consumption. **Food Quality and Preference**, v. 64, p. 66–71, mar. 2018.
- KWON, C. et al. Structural and Physicochemical Characteristics of Granular Malic Acid-Treated Sweet Potato Starch Containing Heat-Stable Resistant Starch. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 1–10, 23 jan. 2019.
- 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, n. 6, p. 283–290, 2003.
- LAGO, C. C.; NOREÑA, C. P. Z. Kinetic and Thermodynamic of Thermal Inactivation of the Peroxidase, Polyphenoloxidase and Inulinase Activities during Blanching of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3560–3568, 2014a.
- LAGO, C. C.; NOREÑA, C. P. Z. Polydextrose as Wall Material for Microencapsulation of Yacon Juice by Spray Drying. **Food and Bioprocess Technology**, 2016.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390–1393, abr. 1997.
- LEE, C. J. et al. Structural Characteristics and In Vitro Digestibility of Malic Acid-Treated Corn Starch with Different pH Conditions. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1900, 17 maio 2019.
- LEE, S. et al. A Study on the Development of Vinegar Beverage Using Yacon Roots (*Smallanthus sonchifolius*) and Analysis of Components Changes During the Fermentation. **Korean J. Food Cookery Sci.**, v. 26, n. 1, p. 95–103, 2010.
- LEONE, R. DE S. et al. Evaluation of dried yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as an efficient probiotic carrier of *Lactobacillus casei* LC-01. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 220–226, 2017.
- LIU, J. et al. Performance of Flash Profile and Napping with and without training for describing small sensory differences in a model wine. **Food Quality and Preference**, v. 48, p. 41–49, 2016.

LUHADIYA, A. P.; YANG, D.; HEISEY, M. **Calcium fortified beverages**, 2005. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20050025861>>. Acesso em: 23 jan. 2020

MABROK, H. et al. HPLC Profiles of Onion Fructooligosaccharides and Inulin and their Prebiotic Effects on Modulating Key Markers of Colon Function, Calcium Metabolism and Bone Mass in Rat Model. v. 1, n. 2, p. 10, 2018.

MAKIMORI, G. Y. F.; BONA, E. Commercial Instant Coffee Classification Using an Electronic Nose in Tandem with the ComDim-LDA Approach. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 5, p. 1067–1076, maio 2019.

MALVESSI, E. et al. Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2013.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 713–721, mar. 2012.

MANZONI, M. S. J. et al. Development of a synbiotic low-calorie beverage made from soy and yacon extracts. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 11, p. 1500–1508, 2012.

MARQUES, C. et al. Flash Profile as an effective method for assessment of odor profile in three different fishes. **Journal of Food Science and Technology**, 2019.

MARQUES, C. et al. Lactobionic acid as a suitable food preservative for yacon juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 64, p. 102400, ago. 2020.

MARQUES, C. et al. Long-term storage of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice: Phytochemical profile, in vitro prebiotic potential and discriminant bioactive properties. **Food Bioscience**, v. 41, n. March, 2021.

MCGLYNN, W. **The Importance of Food pH in Commercial Canning Operations**. Oklahoma: 2016.

MCLAREN, K. XIII-The Development of the CIE 1976 ($L^* a^* b^*$) Uniform Colour Space and Colour-difference Formula. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v. 92, n. 9, p. 338–341, 22 out. 2008.

MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. New York, NY: Springer New York, 2009. v. 3

MERRILL, A.; WATT, B. Energy value of foods - basis and derivation. **USDA Agricultural Research Service Human Nutrition Research Branch**, v. 74, p. 109, 1973.

MERRILL, R. K.; SINGH, M. **Blended cheeses and methods for making such cheeses**, 2005. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20100239713>>

MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 84, n. 4, p. 407–412, 1993.

MIRGOROD, Y. A.; EMELYANOV, S. G. **Method of producing lactobionic acid**, 2015. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/RU2603195C1>>

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. **Colour difference ΔE - A survey**. [s.l.] Machine Graphics and Vision, 2011.

MORAES, M. A.; ROSA, G. S.; PINTO, L. A. A. Equilibrium isotherms of chitin: heat of desorption determination. v. 10, n. 3, p. 212–219, 2007.

MOSCATTO, J. A. et al. The optimization of the formulation for a chocolate cake containing inulin and yacon meal. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 181–188, 2006.

MOURA, N. A. et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2902–2910, 2012.

MURAKAMI, H. et al. Production of calcium lactobionate by a lactose-oxidizing enzyme from *Paraconiothyrium* sp. KD-3. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 55, n. 2, p. 127–132, 2008.

MURAKAMI, M. et al. **Production of yacon juice**, 1998. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/JPH1028566A/en?q=yacon&sort=old&page=1&clustered=false>>

NADEAU, D. B.; CLYDESDALE, F. M. Effect of acid pretreatment on the stability of citric and malic acid complexes with various iron sources in a wheat flake cereal. **Journal of Food Biochemistry**, v. 10, n. 4, p. 241–257, dez. 1986.

NBR. NBR 12806. ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas: Análise sensorial de alimentos e bebidas - terminologia. **Rio de Janeiro**. 1993.

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

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

NIELSEN, P. M. **Meat based food product comprising lactobionic acid**. [2006].

NIGHOJKAR, A.; PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S. Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. In: **Processing and Sustainability of Beverages**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 235–273.

OBANDA, M.; OWUOR, P. O.; TAYLOR, S. J. Flavanol Composition and Caffeine Content of Green Leaf as Quality Potential Indicators of Kenyan Black Teas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, n. 2, p. 209–215, jun. 1997.

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

PADILHA, V. M. et al. Optimization of synbiotic yogurts with yacon pulp (*Smallanthus sonchifolius*) and assessment of the viability of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 37, n. 2, p. 166–175, 2017.

PARUSSOLO, G. et al. Synbiotic ice cream containing yacon flour and *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 192–198, 2017.

PATRON, A. P.; DITSCHUN, T. Compositions for delivering a cooling sensation. In: **Google Patents**. US: US20170087199A1, 2016.

PEDRESCHI, R. et al. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5278–5284, 2003.

PEDRUZZI, I.; DA SILVA, E. A. B.; RODRIGUES, A. E. Selection of resins, equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol. **Separation and Purification Technology**, v. 63, n. 3, p. 600–611, 2008.

PEREIRA, J. A. R. et al. Total antioxidant activity of yacon tubers cultivated in Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 5, p. 596–605, out. 2016.

PEREIRA, J. DE A. R. et al. Studies of chemical and enzymatic characteristics of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its flours. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 1, p. 75–83, mar. 2013.

PHARMACOMPASS. **Prices - Pharmacompass**Pharmacompass, 2020. Disponível em: <<https://www.pharmacompass.com/price>>. Acesso em: 9 fev. 2020

PIGMAN, W. W.; WOLFROM, M. L.; PEAT, S. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. [s.l.] Elsevier Science, 1948.

PINTADO, C. M. B. S.; FERREIRA, M. A. S. S.; SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 240–246, mar. 2010.

PLEISSNER, D. et al. Biotechnological Production of Organic Acids from Renewable Resources. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 1–38.

POLYNT. **Malic Acid - Technical report** Polynt Group Intermediates & Specialties, , 2019. Disponível em: <<https://www.polynt.com/wp-content/uploads/2019/09/Brochure-Polynt-Reichhold-Intermediates-Malic-Acid.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2020

QANNARI, E. M. Sensometrics approaches in sensory and consumer research. **Sensory Sciences and Consumer Perception • Food Physics and Material Science**, v. 15, p. 8–13, 1 jun. 2017.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O. **Análise sensorial para avaliação da qualidade dos alimentos**. Rio Grande: Editora da FURG, 2006.

QUINTEROS, E. T. Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de yacon. p. 164, 2000.

RAATJES, G. J. M.; SMELT, J. P. P. M. **Clostridium botulinum can grow and form toxin at pH values lower than 4.6** [23] **Nature**, 1979.

RATHORE, D. P. S. et al. Indicator for the titrimetric determination of calcium and total calcium plus magnesium with ethylenediaminetetraacetate in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 281, n. 1, p. 173–177, set. 1993.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M. et al. Use of malic acid and other quality stabilizing compounds to assure the safety of fresh-cut “Fuji” apples by inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 2, p. 236–252, maio 2009.

REIS, F. R.; LENZI, M. K.; MASSON, M. L. Effect of vacuum drying conditions on the quality of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) slices: Process optimization toward color quality. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, n. 1, p. 67–73, 2012.

RESEARCH AND MARKETS. **Malic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By End Use (Beverages, Confectionery & Food, Personal Care & Cosmetics), By Region, And Segment Forecasts, 2019 - 2025** **Allied market research**, 2019. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/3934200/malic-acid-market-size-share-and-trends-analysis#rela2-4752320>>. Acesso em: 17 jan. 2020

RIBEIRO, J. C. B. et al. Effect of lactobionic acid on the acidification, rheological properties and aroma release of dairy gels. **Food Chemistry**, v. 207, p. 101–106, 2016.

RICARTE, D. et al. Análise sensorial de preparações com batata yacon: revisão sistemática. **HU Revista**, v. 45, n. 4, p. 431–440, 14 fev. 2020.

ROBERFROID, M. B.; CUMPS, J.; DEVOGELAER, J. P. Dietary chicory inulin increases whole-body bone mineral density in growing male rats. **J Nutr.**, v. 132, n. 12, p. 3599–3602, 2002.

ROBIN, F.; PALZER, S. Texture of breakfast cereals and extruded products. In: **Modifying Food Texture**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 203–235.

RODRIGUES, M. Z. et al. Application of antioxidants to extend the shelf life of processed minimally yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 28, 2013.

RODRIGUES, O. R. L.; ASQUIERI, E. R.; ORSI, D. C. Prevention of enzymatic browning of yacon flour by the combined use of anti-browning agents and the study of its chemical composition. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 2, p. 275–280, 2014.

- ROLIM, P. M. et al. Análise de componentes principais de pães de forma formulados com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 12–17, fev. 2010.
- ROSA, C. S. et al. Elaboração de bolo com farinha de Yacon. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1869–1872, set. 2009.
- ROSSI, M. et al. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6150–6158, 1 out. 2005.
- RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, 2010.
- SAARELA, M. et al. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 291–302, 2003.
- SAARELA, M. et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1477–1482, 2006.
- SAARELA, M. et al. Acid tolerant mutants of Bifidobacterium animalis subsp. lactis with improved stability in fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1012–1018, 2011.
- SALDAÑA, E. et al. Measurement parameter of color on yacon (*Smallanthus sonchifolius*) slices using a computer vision system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P2, p. 1220–1226, 2014.
- SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M. J. et al. Manufacturing of Short-Chain Fructooligosaccharides: from Laboratory to Industrial Scale. **Food Engineering Reviews**, v. 12, n. 2, p. 149–172, jun. 2020.
- SÁNCHEZ-ZAPATA, E. et al. In vitro evaluation of “horchata” co-products as carbon source for probiotic bacteria growth. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 3, p. 279–286, jul. 2013.
- SANTA CRUZ, B. **Section 1 - CHEMICAL PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION**. Santa Cruz, California, 2019.
- SANTANA, I.; CARDOSO, M. H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 898–905, 2008.
- SARENKOVA, I.; CIPROVICA, I. The current status and future perspectives of lactobionic acid production : a review. v. 1, p. 233–239, 2018.
- SATO, H. **Cheese production method and preparation for cheese reformulation**, 2016. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/WO2016136906A1/en>>
- SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 458–465, 2008.
- SCHER, C. F.; BRANDELLI, A.; NOREÑA, C. Z. Yacon inulin leaching during hot water blanching. **Ciência e Agrotecnologia**, 2015.
- SCOPUS. **Web of Science - Yacon publications research (TI=(yacon* OR polynnia sonchifolia* OR smallanthus sonchifolius))** Web of Science, 2019. . Acesso em: 12 nov. 2019
- SEISONEN, S.; VENE, K.; KOPPEL, K. The current practice in the application of chemometrics for correlation of sensory and gas chromatographic data. **Food Chemistry**, v. 210, p. 530–540, nov. 2016.
- SHALABY, A. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 10, p. 528–539, 15 mar. 2013.
- SILVA, D. M. et al. Physical and chemical characterization of yacon tuberous roots at different altitudes and planting times. **Horticultura Brasileira**, 2018.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo, SP: Livraria Varela, 2007.

SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Experimental design and chemometric techniques applied in electronic nose analysis of wood-aged sugar cane spirit (cachaça). **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100037, dez. 2020.

SOUSA, S. et al. In vitro evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 96–105, 2015a.

SOUSA, S. et al. Antioxidant properties of sterilized yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour. **Food Chemistry**, v. 188, p. 504–509, 2015b.

SREEDEVI, P.; JAYACHANDRAN, L. E.; RAO, P. S. Kinetic modeling of high-pressure induced inactivation of polyphenol oxidase in sugarcane juice (*Saccharum officinarum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2365–2374, 2019.

STERNBERG, M.; LOCKWOOD, L. B. Oxidation of Isomaltose by *Pseudomonas taetrolens*. **Journal of Bacteriology**, v. 99, n. 2, p. 623, ago. 1969.

STODOLA, F. H.; LOCKWOOD, B. L. The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas*. **J Biol Chem**, p. 213–221, 1947.

SULAIMAN, A. et al. Modeling the polyphenoloxidase inactivation kinetics in pear, apple and strawberry purees after High Pressure Processing. **Journal of Food Engineering**, 2015.

SUNDGREN, A.; RAY, C.; NIELSEN, J. H. **Improved milk and milk-related products**, 2017. Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/EP2988601B1?cl=und>>

TAKENAKA, M. et al. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 793–796, 2003.

TERHAAG, M. M.; BENASSI, M. D. T. Perfil Flash: uma opção para análise descritiva rápida. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. EE01, p. 140–151, 2011.

THE PLANT LIST. **Yacon classification**The Plant List, 2019. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-3810>>

THERON, M. M.; LUES, J. F. R. **Organic Acids and Food Preservation**. [2010].

THOMAS, W.; ALIREZA, H. B. **Flavor-enhancing agent**. [2008].

TIEFENBACHER, K. F. Glossary of Terms in Wafers, Waffles and Adjuncts. In: **The Technology of Wafers and Waffles II**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 325–411.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 1–14, abr. 2008.

VALENTOVÁ, K. et al. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 61–66, 2003.

VALENTOVÁ, K. et al. The biological and chemical variability of yacon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1347–1352, 2006.

VALENTOVÁ, K. et al. Induction of glucokinase mRNA by dietary phenolic compounds in rat liver cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7726–7731, 2007.

VALENTOVÁ, K. et al. Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: In vivo safety assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1006–1013, 2008.

VARA-UBOL, S.; CHAMBERS, E.; CHAMBERS, D. H. SENSORY CHARACTERISTICS OF CHEMICAL COMPOUNDS POTENTIALLY ASSOCIATED WITH BEANY AROMA IN FOODS. **Journal of Sensory Studies**, v. 19, n. 1, p. 15–26, fev. 2004.

VASCONCELOS, C. M. et al. Evaluating Strategies to Control Enzymatic Browning of Minimally Processed Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 9, p. 1982–1994, 2015.

VAZ-TOSTES, M. DAS G. et al. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 30, n. 6, p. 666–72, jun. 2014.

VIEIRA, T. F. et al. Chemometric Approach Using ComDim and PLS-DA for Discrimination and Classification of Commercial Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 1, p. 97–107, jan. 2020.

VILHENA, S. M. C.; CÂMARA, F. L. A.; KAKIHARA, S. T. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 5–8, 2000.

VOLSCHENK, H.; VAN VUUREN, H. J. J.; VILJOEN-BLOOM, M. Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. **South African Journal of Enology & Viticulture**, v. 27, n. 2, mar. 2017.

WANG, L. et al. Characterization of the Genes Involved in Malic Acid Metabolism from Pear Fruit and Their Expression Profile after Postharvest 1-MCP/Ethrel Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 33, p. 8772–8782, 22 ago. 2018.

WATSON, D. et al. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1132–1146, abr. 2013.

WHO. Macroeconomics and health: Investing in health for economic development. In: **World Health Organization**. Geneva, p. 213.

YA, Z.; QI-LONG, S. Study on the properties of polyphenol oxidase and non-sulfur anti-browning of yacon. v. 04, 2014.

YAMAMORI, Y. **Squeezing of transparent concentrated juice from yacon juice without decomposing fructo-oligosaccharide**, 1998. Disponível em:

<<https://patents.google.com/patent/JP2000157233A/en?q=yacon+in+food&sort=old&page=2>
<https://patents.google.com/patent/JP2000157233A/en?q=yacon&sort=old&page=1&clustered=false>>

YIMENU, S. M.; KIM, J. Y.; KIM, B. S. Prediction of egg freshness during storage using electronic nose. **Poultry Science**, v. 96, n. 10, p. 3733–3746, out. 2017.

YOO, S.-H. et al. Characteristics of enzymatically-deesterified pectin gels produced in the presence of monovalent ionic salts. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1926–1929, out. 2009.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K.-H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201–215, 2016.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 361–422, nov. 2003.

ZHENG, H.; LU, H. Use of kinetic, Weibull and PLSR models to predict the retention of ascorbic acid, total phenols and antioxidant activity during storage of pasteurized pineapple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1273–1281, 2011.

ANEXO A – E-MAIL DA ANVISA

Salvo 19/02/2018

Gmail - Anvisa - Resposta ao Protocolo 2017883815.



Caroline Marques
<caroolmarques@gmail.com>

Anvisa - Resposta ao Protocolo 2017883815.

2 mensagens

Central de Atendimento ao Público - Anvisa <atendimento.central@anvisa.gov.br> 1 de
dezembro de 2017 17:47 Para: "caroolmarques@gmail.com" <caroolmarques@gmail.com>

Prezado (a) Senhor (a),

Em atenção a sua solicitação, informamos que os ingredientes alimentares com finalidade tecnológica, inclusive antioxidantes, são classificados como aditivos alimentares.

A legislação brasileira sobre aditivos alimentares é positiva e estabelece que um aditivo somente pode ser utilizado pela indústria alimentícia quando estiver explicitamente definido em legislação específica, com as respectivas funções, limites e categorias de alimentos permitidas. Assim, o que não constar na legislação não tem permissão para ser utilizado em alimentos.

Para solicitação de inclusão de novos aditivos alimentares ou coadjuvantes de tecnologia na legislação brasileira, sugerimos consultar o Guia para Pedidos de Inclusão e Extensão de Uso de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação na Legislação Brasileira, disponível no portal da Anvisa

Link: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/aditivos-alimentares>

Por favor, avalie a resposta recebida acessando o link:

<https://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/241521?lang=pt-BR&encode=>

Atenciosamente,

Anvisa Atende
Central de Atendimento
Agência Nacional
de Vigilância
Sanitária 0800
642 9782

www.anvisa.gov.br

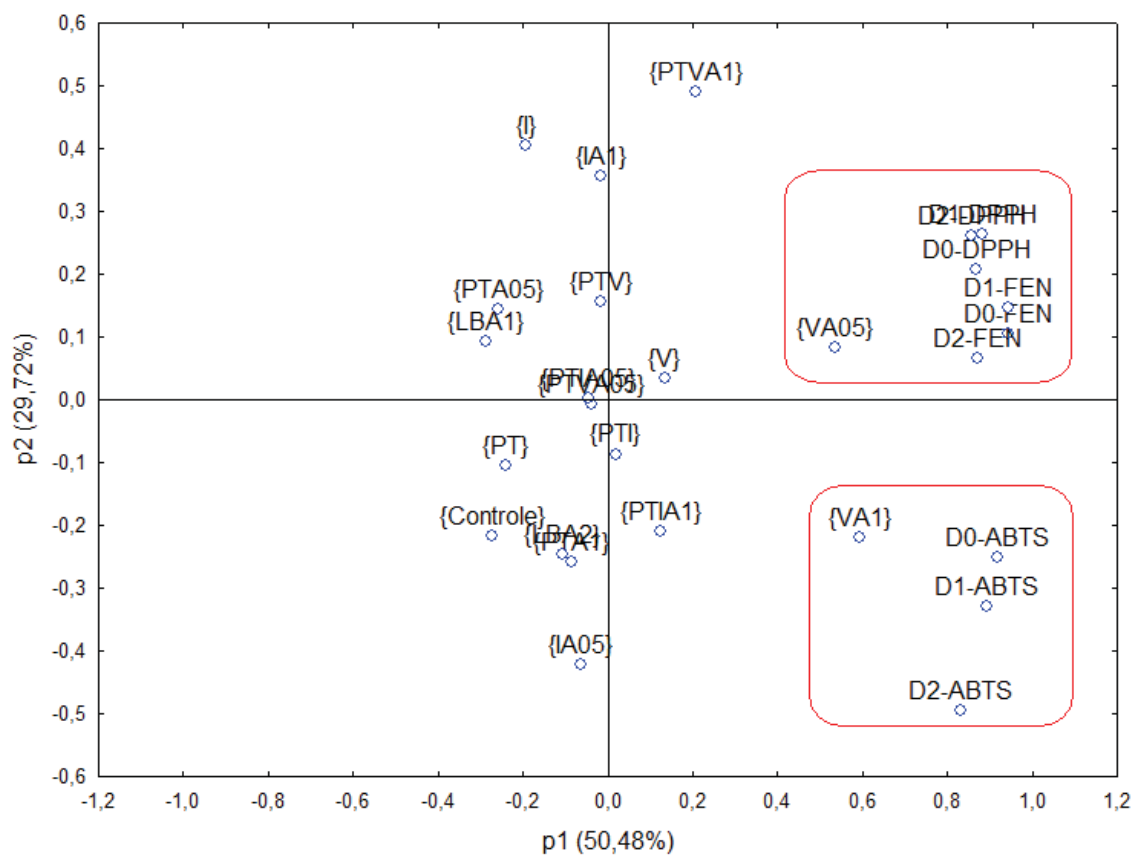
Siga a Anvisa: [www.twitter.com/anvisa_oficial](https://twitter.com/anvisa_oficial)

Este endereço eletrônico está habilitado apenas para enviar e-mails. Caso deseje entrar em contato com a central, favor ligar no 0800 642 9782 ou acessar o “Fale Conosco”, disponível no portal da ANVISA (link: <http://portal.anvisa.gov.br/fale-conosco>). As ligações podem ser feitas de segunda a sexta - feira, das 7h30 às 19h30, exceto feriados.

https://mail.google.com/mail/ca/u/0/?ui=2&ik=76a8241116&jsver=xKlmQMq8GQ.pt_BR.&view=pt&q=anvisa&q=qs=true&search=query&th=160147... 1/1

9.2 APÊNDICES

APÊNDICE A



Análise de componentes principais para escolher o tratamento ideal para continuar com os diferentes testes de ácido; 80,21% da soma dos quadrados foi explicada pelos dois primeiros componentes extraídos. D0 = leituras iniciais; D1 = 24 horas e D2 = 48 horas. DPPH, ABTS e conteúdo fenólico foram considerados. PT = pré-tratamento; V = vapor; I = imersão; A05 = ácido lactobiônico a 0,5% e A1 = ácido lactobiônico a 1%.

APÊNDICE B

Tabela 1 – Solubilidade do ácido málico, em fração mássica (m), em água e diferentes temperaturas

Temperatura (°C) ^(a)	100 m ^(b)
10	48,12
15	48,84
20	49,85
25	50,11
30	50,71
35	53,28
40	54,03
45	55,14
50	56,39
55	61,49

^(a) Incertezas padrão de T são $u(T) = 0,5$ °C

^(b) Incertezas padrão de m são $u(m) = 0,001$ g

APÊNDICE B

Tabela 2 – Comportamento antioxidante, de pH, quelante e antibacteriano do DL-ácido málico em soluções de diferente concentração

Parâmetros físico-químicos	Soluções de DL – ácido málico				
	60%	40%	20%	10%	1%
pH	1,23 ^a ± 0,03	1,37 ^b ± 0,06	1,55 ^c ± 0,02	1,67 ^d ± 0,01	2,09 ^e ± 0,02
DPPH	95,42 ^a ±	86,81 ^b ±	72,08 ^c ± 0,20	62,22 ^d ±	47,50 ^e ± 0,79
(uM Trolox eq.L⁻¹)	0,98	0,59		0,79	
DPPH (%)	42,97 ^a ±	39,27 ^b ±	32,96 ^c ± 0,08	28,72 ^d ±	22,41 ^e ± 0,34
	0,42	0,25		0,34	
Quelante de ferro* (mg EDTA.mL⁻¹)	0,179 ^a ±	0,161 ^{ab} ±	0,118 ^{ab} ±	0,063 ^{ab} ±	0,009 ^b ±
	0,001	0,001	0,002	0,000	0,000
Quelante de ferro* (%)	94,134 ^a ±	84,544 ^{ab} ±	61,967 ^{ab} ±	56,198 ^{ab} ±	8,350 ^b ±
	0,262	0,294	0,696	0,308	1,635
Quelante de cálcio (%)	62,50 ^a ±	34,29 ^b ±	28,57 ^c ± 1,89	16,22 ^d ±	15,79 ^e ± 1,13
	1,30	2,45		2,11	
Atividade antibacteriana (mm)					Antibiótico**
<i>E. coli</i>	14,08 ^b ±	12,97 ^{bc} ±	11,85 ^c ± 0,63	8,62 ^d ± 0,25	28,88 ^a ± 0,48
(G-)	0,11	0,45			
<i>Salmonella</i>	17,99 ^b ±	14,32 ^{bc} ±	11,26 ^{cd} ±	8,86 ^d ± 1,36	28,94 ^a ± 1,28
(G-)	1,51	0,59	0,34		
<i>C. perfringens</i>	17,32 ^b ±	15,19 ^{bc} ±	11,94 ^{cd} ±	8,86 ^d ± 0,29	28,37 ^a ± 1,66
(G+)	0,66	0,67	1,56		
<i>S. aureus</i>	16,98 ^b ±	15,45 ^c ± 0,26	11,67 ^d ±	8,48 ^e ± 0,25	29,86 ^a ± 0,84
(G+)	0,12		0,02		
<i>L. monocytogenes</i> (G+)	17,58 ^b ±	14,98 ^c ± 0,14	13,15 ^d ±	8,91 ^e ± 0,04	28,37 ^a ± 0,95
	0,08		0,11		

* Teste de Kruskal-Wallis realizado entre os tratamentos; n = 3

ANOVA e teste de Tukey entre os demais tratamentos p < 0,05; n = 3

Letras diferentes em uma linha significam diferença significativa entre os tratamentos.

** Como o ácido málico a 1% não deu resultados à inibição bacteriana, a coluna foi substituída pelos resultados de antibióticos para comparação (controle).

(G+) = Gram-positivo e (G-) = Gram-negativo

APÊNDICE B

Tabela 3 – Viscosidade dos géis de pectina com os ácidos málico, cítrico e LBA

Tempo (s)	Gel com ácido cítrico Viscosidade (Pa·s)	Gel com ácido málico Viscosidade (Pa·s)	Gel com LBA Viscosidade (Pa·s)
6	515,865	472,747	643,320
12	387,869	371,255	527,543
18	159,546	200,725	342,729
24	99,178	109,873	237,593
30	54,020	69,568	183,003
36	29,568	42,675	141,825
42	23,964	26,882	111,748
48	17,623	18,352	88,934
54	14,685	15,743	72,040
60	11,871	12,355	54,368
66	10,474	10,555	38,283
72	8,292	9,234	35,035
78	6,126	7,763	31,636
84	5,021	6,486	28,432
90	4,481	5,720	25,739
96	3,859	4,494	22,585
102	3,322	3,813	19,976
108	2,866	3,726	17,962
114	2,586	3,121	15,429
120	2,159	2,818	13,199
126	2,121	2,636	11,090
132	1,844	2,321	10,234
138	1,631	2,010	9,382
144	1,524	1,943	8,774
150	1,401	1,794	8,084
156	1,319	1,653	7,403
162	1,238	1,533	6,741
168	1,121	1,534	6,202
174	1,028	1,407	5,533
180	0,969	1,281	4,867
186	0,973	1,253	4,297
192	0,852	1,209	4,114
198	0,792	1,118	3,884
204	0,757	1,073	3,700
210	0,768	1,023	3,510
216	0,739	0,953	3,301
222	0,710	0,913	3,122
228	0,669	0,899	2,969
234	0,642	0,857	2,788
240	0,610	0,807	2,598
246	0,590	0,782	2,434
252	0,566	0,744	2,342
258	0,541	0,712	2,255
264	0,513	0,704	2,192
270	0,497	0,656	2,090
276	0,486	0,631	2,011

Tempo (s)	Gel com ácido citríco Viscosidade (Pa·s)	Gel com ácido málico Viscosidade (Pa·s)	Gel com LBA Viscosidade (Pa·s)
282	0,479	0,610	1,936
288	0,458	0,594	1,866
294	0,465	0,572	1,789
300	0,434	0,557	1,719

APÊNDICE C



Gráfico 1 – Resultados do teste de gostos básicos, considerando 19 avaliadores aptos a fazerem parte do painel.

Os avaliadores que confundiram umami com salgado obtiveram 0,5 pontos.

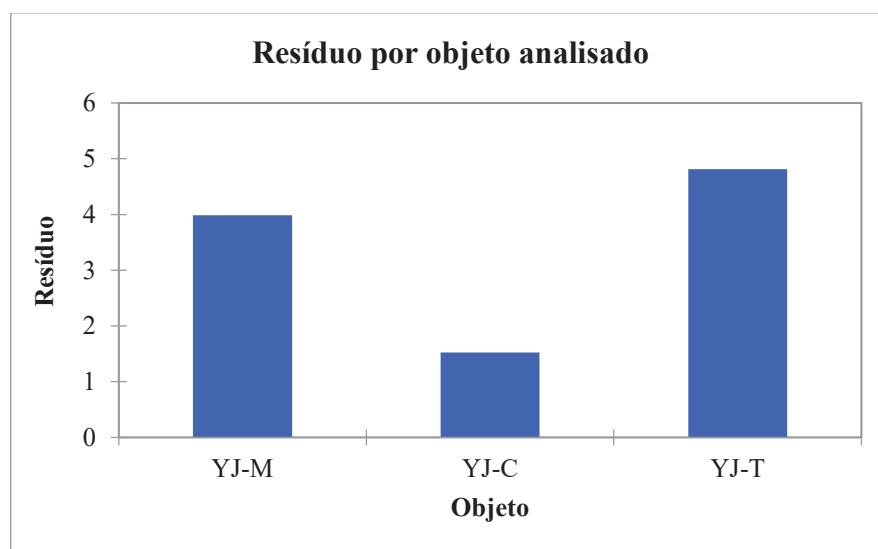


Gráfico 2 – Valores residuais da Análise de Pcrustes Generalizada por objeto.

Quadro 1 – Avaliação da pontuação do teste de odores. Resultados dos primeiros cinco avaliadores.

	Soma	Ordem de dificuldade	A1	A2	A3	A4	A5
Grupo 1 - Especiarias	441	5	Escore	Escore	Escore	Escore	Escore
Oregano			4	4	5	5	5
Cravo			5	5	5	5	5
Canela			5	5	5	5	5
Alecrim			3	3	4	4	4
Grupo 2 – Resinoso	348	2					
Vinagre			5	3	5	1	1
Kiboa			5	3	5	5	0
Eucalipto			4	4	4	4	4
Batata			1	0	1	2	5
Grupo 3 – Floral	393	3					
Perfume de rosas			3	3	5	3	4
Sabão em pó			5	3	5	4	5
Amaciante			3	4	3	5	5
Lavanda			3	3	3	3	1
Grupo 4 – Frutado	385	4					
Baunilha			3	2	5	5	5
Uva			3	3	3	4	3
Banana			3	5	5	5	5
Laranja			3	5	5	5	5
Grupo 5 – Queimado	302	1					
Cinzas			5	5	1	3	3
Café			5	5	5	5	5
Açúcar queimado			3	0	0	0	2
Papel queimado			1	0	0	3	0

As respostas totalmente assertivas pontuaram 5 (cinco), parcialmente assertivas 3 (três) e nenhuma descrição ou resposta não correlacionada pontuaram 0 (zero).

Quadro 2 – Exemplo de cálculo do teste de odor, para o avaliador 1 (A1).

A1	<i>Escore transformados</i>	Aptitude	Grupo de aptitude	Desvio por grupo	
Escores Individuais	5	Soma	Amplitude		Soma
4	4	17	2	5	
5	5			0	
5	5			0	
3	3			5	10
	2				
5	2	6	1,6	0	
5	2			0	
4	1,6			2	
1	0,4			2	4
	3				
3	1,8	8,4	1,2	3	
5	3			0	
3	1,8			3	
3	1,8			3	9
	4				
3	2,4	9,6	0	4	
3	2,4			4	
3	2,4			4	
3	2,4			4	16
	1				
5	1	2,8	0,8	0	
5	1			0	
3	0,6			1	
1	0,2			1	2
72		14,2	2		
Aptidão:	7.1	Desvio geral	41	SELECIONADO	>1