

CINTHIA KARLA RODRIGUES DO MONTE GUEDES

POTENCIAL TECNOLÓGICO DO
INHAME (*Dioscorea cayennensis*) NA FORMULAÇÃO DE
BEBIDAS FUNCIONAIS À BASE DE FRUTAS TROPICAIS E
Lactobacillus casei.

RECIFE

2014

CINTHIA KARLA RODRIGUES DO MONTE GUEDES

POTENCIAL TECNOLÓGICO DO
INHAME (*Dioscorea cayennensis*) NA FORMULAÇÃO DE
BEBIDAS FUNCIONAIS À BASE DE FRUTAS TROPICAIS E
Lactobacillus casei.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford

RECIFE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G924p Guedes, Cinthia Karla Rodrigues do Monte.
Potencial tecnológico do inhame (*Dioscorea cayennensis*) na
formulação de bebidas funcionais à base de frutas tropicais e
Lactobacillus casei / Cinthia Karla Rodrigues do Monte Guedes. – Recife:
O autor, 2014.
190 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Tânia Lúcia Montenegro Stamford.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Dioscorea. 2. Lactobacillus casei. 3. Alimento funcional. I.
Stamford, Tânia Lúcia Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-069)

CINTHIA KARLA RODRIGUES DO MONTE GUEDES

**Potencial tecnológico do
inhame (*Dioscorea cayennensis*) na formulação de bebidas funcionais à base
de frutas tropicais e *Lactobacillus casei*.**

Tese aprovada em: 16 de Maio de 2014

Celiane Gomes Maia da Silva

Doutora em Nutrição – UFPE. Professora Adjunto - UFRPE

Maria Cristina Delgado da Silva

Doutora em Ciências (Microbiologia)-UFRJ. Professora Associada-UFAL

Marisilda de Almeida Ribeiro

Doutora em Ciências dos Alimentos – USP. Professora Adjunto – UFPE

Patricia Moreira Azoubel

Doutora em Engenharia de Alimentos-UNICAMP. Professora Adjunto-UFPE

Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Doutora em Ciências de Materiais – UFPE – Bolsista PNPd – CAPES

RECIFE

2014

À minha família: base, fortaleza e razão de ser.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas recompensas da vida e pela energia maior que impulsiona ao crescimento. É uma dádiva ter fé em Ti.

A Jesus Cristo, nosso mestre e amigo. Tenho convicção de Tuas obras em minha vida.

À minha querida e amada mãe, Fátima, por todo amor e apoio constante. Só tenho a agradecer por tê-la em minha vida.

Ao meu amado marido Andrei, meu porto seguro, amigo e conselheiro. Não poderia haver companheiro melhor. Obrigada por todas as idas às Universidades, por pensar comigo nas etapas e metodologias e por me ajudar na concretização desta etapa.

Aos meus filhos queridos Vinícius e Maria Luiza. Meus pequenos grandes amores. Chegaram abrilhantando meu caminho e iluminando ainda mais esta etapa. O primeiro chegou ao princípio e o segunda no desfecho do meu doutorado. Não poderia ter sido melhor!

Aos meus familiares, meus amores verdadeiros, sempre presentes alegrando e dando sentido à minha vida.

À minha orientadora, Prof^a. Tânia e à minha co-orientadora, Prof^a Thayza pela oportunidade para realização do meu doutorado e ajuda nos momentos de necessidade. Muito obrigada!

Às minhas queridas estagiárias Emanuele, Eveline e Joyce, suporte imprescindível em muitas etapas de realização deste trabalho. Obrigada pela dedicação.

Aos técnicos do LEAAL Vivaldo, Moisés, Suelen, Olívia, Camilo e Alexandre pela ajuda inestimável em várias etapas da elaboração deste trabalho. Com vocês tudo foi mais fácil.

À Edneide pela disposição e ajuda nas etapas desenvolvidas na Universidade Federal de Alagoas.

Aos colegas do doutorado pelos momentos de felicidade e descontração em meio aos estudos.

Aos professores, em especial à Gisélia Alves, por aguçar minha visão crítica.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição pelo suporte no desenvolvimento deste estudo.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE por possibilitar a realização das análises microestruturais, em especial à Raphael Fonseca pela disponibilidade, atenção e ajuda prestada.

Aos membros da banca que se dispuseram a participar das mais diversas etapas da elaboração deste trabalho.

Agradeço imensamente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O consumo de alimentos in natura em detrimento dos industrializados vem ganhando destaque mercadológico uma vez que a implementação da nutrição funcional vem sendo fortemente considerada e aplicada pela população. Apesar dos benefícios da inserção de alimentos probióticos na alimentação, sua aplicação não tem se concretizado de forma homogênea, uma vez que indivíduos com intolerâncias ou alergias alimentares, especialmente a produtos lácteos, principal veículo destes ingredientes, acabam por não fazer uso desses alimentos. A formulação de bebidas de origem vegetal tem se mostrado uma alternativa promissora para transpor tais dificuldades. O objetivo deste estudo foi elaborar bebidas funcionais à base de frutos tropicais (maracujá, manga e abacaxi), adicionadas de farinha de inhame (FI) e fermentadas com *Lactobacillus casei*. Para realização dos experimentos a FI foi desenvolvida e caracterizada e as bebidas desenvolvidas a partir da fermentação dos sucos tropicais das frutas adicionados da FI. A composição centesimal das bebidas elaboradas bem como a qualidade microbiológica foram determinadas. O perfil sensorial, a estabilidade ao armazenamento ao longo de 28 dias e resistência do *L. casei* à passagem pelo trato gastrointestinal humano (TGI), por simulação in vitro, foram analisadas. A farinha apresentou boa composição nutricional, sendo rica em carboidratos, especialmente amido e fibras. Apresentou microestrutura heterogênea, estabilidade ao armazenamento e discreta alteração cromática ao longo de 180 dias. As bebidas desenvolvidas apresentaram excelente composição nutricional, sendo ricas em fibras. A análise sensorial evidenciou que àquelas formuladas com adição de 2% da FI foram mais bem aceitas. Todas apresentaram *off-flavor*, sendo o principal interferente para a aceitação das bebidas, entretanto o maracujá, quando comparado aos outros frutos, mostrou maior capacidade de mascará-lo. O *L. casei* apresentou excelente resistência à simulação in vitro da passagem pelo TGI em todas as bebidas desenvolvidas, evidenciando que a combinação dos sucos com a FI foi uma excelente alternativa para enriquecer o meio e promover o crescimento e manutenção do probiótico. A FI e sua associação com sucos tropicais e *L. casei* mostraram ser excelentes alternativas para o desenvolvimento de bebidas funcionais de origem vegetal. Mais estudos em busca de alternativas para melhorar os aspectos sensoriais das bebidas são requeridos.

Palavras-chave: *Dioscorea*. *Lactobacillus casei*. Alimento funcional.

ABSTRACT

The consumption of fresh food instead of industrialized marketing has been gaining momentum since the implementation of functional nutrition is being strongly considered and applied by the population. Despite the benefits of inclusion of probiotics in food supply, its application has not been realized homogeneously, since individuals with food allergies or intolerances, especially dairy products, the main vehicle of these ingredients, end up not making use of these foods. The formulation of plant origin beverages have showing to be a promising alternative to overcome such difficulties. The aim of this study was to elaborate functional beverages based on tropical fruit (passion fruit, mango and pineapple), Yam Flour (YF) and fermented with *Lactobacillus casei*. For the experiments the YF was developed and characterized and drinks developed by the fermentation of tropical fruit juices added the YF. The chemical composition of beverages prepared and microbiological quality were determined. The sensory profile, the storage stability thru 28 days and the *L. casei* resistance to passage through the human gastrointestinal tract (HGT) by in vitro simulation were analyzed. The flour showed good nutritional composition, being rich in carbohydrates, especially starch and fiber. It showed heterogeneous microstructure, storage stability and slight change of color over 180 days. Developed beverages showed excellent nutritional composition, being rich in fiber. Sensory analysis showed that those formulated with addition of 2% of YF were more accepted. All beverages presented off-flavor, the main interferer for accepting drinks, however the passion fruit, when compared to other fruits, showed greater ability to mask it. The *L. casei* showed excellent resistance in vitro simulation of the passage by HGT in all developed beverages, showing that the combination of tropical juices with the YF was a great alternative to enrich the environment and promote the growth and maintenance of probiotic. The YF and its association with tropical juices and *L. casei* proved to be excellent alternatives for the development of functional beverages of plant origin. More studies in search of alternatives to improve the sensory aspects of the drinks are required.

Keywords: *Dioscorea*. *Lactobacillus casei*. Functional food.

SUMÁRIO

	Página
1 APRESENTAÇÃO	01
2 HIPÓTESES	05
3 OBJETIVOS	07
3.1 Objetivo geral	08
3.2 Objetivos específicos	08
4 REVISÃO DA LITERATURA	09
4.1 Artigo de revisão	11
4.2 Alimentos funcionais	34
4.3 Probióticos e prebióticos	37
4.4 <i>Lactobacillus casei</i>	41
4.5 Frutos tropicais	43
4.5.1 Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L. Merrill)	44
4.5.2 Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	45
4.5.3 Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	46
4.6 Bebidas probióticas de origem vegetal	46
5 MÉTODOLOGIA	49
5.1 Elaboração da farinha de inhame	50
5.2 Caracterização da farinha de inhame	53
5.2.1 Análises físico-químicas e valor energético total	53
5.2.2 Análises microbiológicas	55
5.2.3 Estabilidade da farinha ao armazenamento	55
5.2.4 Determinação de frutanos totais	56
5.2.5 Caracterização cromática	56
5.2.6 Análise Granulométrica por Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS (Dynamic Light Scattering)	56
5.2.7 Difração de Raio-X	57
5.2.8 Espectroscopia de infravermelho	57
5.2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
5.3 Obtenção das polpas dos frutos	57
5.4 Obtenção dos sucos tropicais	59

5.5	Desenvolvimento das bebidas	60
5.5.1	Ativação e viabilização da cepa	60
5.5.2	Adição dos probióticos às bebidas	61
5.5.3	Fermentação	61
5.6	Análises microbiológicas das bebidas	62
5.7	Validação do processo fermentativo	62
5.8	Análise sensorial das bebidas	62
5.8.1	Aspectos éticos	62
5.8.2	Teste de aceitabilidade	62
5.8.3	Teste de intenção de compra	63
5.8.4	Teste de ordenação de preferência	63
5.9	Determinação da composição centesimal dos bioprodutos	63
5.10	Análise da sobrevivência do <i>L. Casei</i> a fluidos simulados do trato gastrointestinal	63
5.10.1	Resistência ao ácido e à pepsina (Simulação da fase gástrica)	64
5.10.2	Resistência aos sais biliares (Simulação da fase entérica)	64
5.11	Avaliação da vida em prateleira das bebidas funcionais	64
5.12	Processamento e análise dos dados	65
6	RESULTADOS	66
6.1	Caracterização da farinha de inhame	68
6.1.1	Análises físico-químicas e valor energético total	70
6.1.2	Análises microbiológicas e estabilidade da farinha ao armazenamento	71
6.1.3	Determinação de frutanos totais	73
6.1.4	Caracterização cromática	73
6.1.5	Análise Granulométrica por Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS (Dynamic Light Scattering)	74
6.1.6	Difração de Raio-X	75
6.1.7	Espectroscopia de infravermelho	75
6.1.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	76
6.2	Artigo original 1	78
6.3	Artigo original 2	108
6.4	Artigo original 3	137
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	166

REFERÊNCIAS	167
APÊNDICES	179
Apêndice 1 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido	180
Apêndice 2 - Ficha para análises sensoriais	184
ANEXOS	186
Anexo 1 – Comprovante de submissão do artigo de revisão	187
Anexo 2 - Parecer consubstanciado do CEP	188
Anexo 3 – Comprovante de submissão do artigo original 1	190

Apresentação

1. APRESENTAÇÃO

A busca atual pela saúde e bem estar envolve uma série de questões holísticas e a nutrição ocupa parte importante neste cenário. A redução do risco de doenças aliada a uma qualidade de vida apontam cada dia mais para uma alimentação saudável e equilibrada, embasados numa vasta ciência que ao longo do seu desenvolvimento evidencia mais fortemente a necessidade do consumo de alimentos *in natura* em detrimento daqueles industrializados.

Em contraste a essa premissa, a tecnologia desempenha papel essencial na inserção de alimentos saudáveis para a população, uma vez que busca a associação da nutrição básica, que visa à oferta adequada de macro e micronutrientes, com a nutrição funcional que visa além da nutrição clássica o acréscimo das propriedades funcionais para a prevenção ou tratamento de acometimentos à saúde, inibindo a instalação de algumas doenças. Esta nova visão possibilita o desenvolvimento de novos produtos.

Prezando pela perspectiva de melhoria da qualidade de vida, atualmente existe uma preocupação mais acentuada na questão da sustentabilidade. Desta forma a formulação de novos produtos deve estar fundamentada ainda na viabilidade e na disponibilidade de alimentos. A escolha de recursos renováveis e de custo acessível deve ser considerada para o desenvolvimento de novas pesquisas. A identificação de novas matérias primas é um grande desafio (LUCKNOW; DELAHUNTY, 2004).

O inhame (*Dioscorea sp.*) é um alimento regional muito popular no Nordeste Brasileiro, sendo consumido por grande parte da população. Apresenta boa aceitabilidade além de baixo custo e excelentes características nutricionais como alto valor energético e nutritivo, além de um considerável teor de fibras alimentares (LEONEL et al., 2006; TACO, 2011).

O tubérculo desempenha um papel de destaque no desenvolvimento rural e econômico mundial, uma vez que sua produção ultrapassa 37 milhões de toneladas ao ano (OPARA, 2003; FAO, 2013). Existem cerca de 600 espécies do tubérculo (PURSEGLOVE, 1975), sendo a *Dioscorea cayennensis* a mais disseminada no Nordeste Brasileiro (SANTOS, 1996). Apesar do destaque apresentado existem poucos estudos a respeito das suas propriedades funcionais e potencial tecnológico.

Ainda que pouco estudada, a farinha do inhame tem se revelado promissora para o desenvolvimento de produtos para fins especiais, caso da doença celíaca, uma vez que não

possui glúten (ATZINGEN et al., 2001), para o aumento do teor de fibras de preparações devido a sua composição química (ZÁRATE; VIEIRA, 2006) e ainda para conferir propriedades funcionais aos produtos (LIMA, 2002; JHENG et al., 2012).

A crescente busca pela implementação de alimentos funcionais na alimentação humana, em particular os probióticos, justifica-se pela gama de benefícios trazidos ao consumidor, dentre os quais pode-se citar a prevenção da disbiose (ZOPPI et al., 2001), a diminuição dos quadros de constipação e diarreia (VANDENPLAS; BENNINGA, 2009; KRAMMER et al., 2011), além dos benefícios imunológicos (CALDER; KEW, 2002) e mais recentemente sugerido, na prevenção da obesidade (SCARPELLINI et al., 2010; LECERF, 2011), um atual problema de saúde pública.

Apesar dos benefícios da inserção de alimentos probióticos na alimentação, sua aplicação prática não tem se concretizado de forma homogênea, uma vez que indivíduos com intolerâncias ou alergias alimentares, especialmente a produtos lácteos, principal veículo destes ingredientes, acabam por não fazer uso desses alimentos (SCHMIDT; PEREIRA, 2011). A formulação de bebidas de origem vegetal tem se mostrado uma alternativa promissora para transpor tais dificuldades (YOON et al., 2006, RENUKA et al., 2008).

O desenvolvimento de *off-flavor* devido à fermentação é mais evidente em bebidas à base vegetal que nas produzidas com leite e seus derivados (LUCKNOW; DELAHUNTY, 2004). A escolha de um vegetal tecnologicamente capaz de mascarar tal efeito é um grande desafio. Segundo Luckow et al. (2006) uma das maneiras mais eficientes de mascarar o *off-flavor* é o uso de sucos de frutas tropicais com sabor marcante, caso do maracujá, manga e abacaxi.

A Região Nordeste Brasileira, dentre outras culturas, é um grande produtor e consumidor de frutas tropicais. Estas frutas apresentam um excelente valor nutricional, tendo o seu consumo estimulado. Entretanto devido a questões de sazonalidade das safras a disponibilidade destes frutos é limitada em alguns meses do ano (IBGE, 2014). O consumo na forma de bebida aumentaria o tempo de oferta das mesmas.

Ainda que promissora, a fermentação de bebidas à base de frutas com bactérias lácteas traz ainda o desafio de manutenção da viabilidade e funcionalidade durante o tempo de estocagem (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Desta forma o uso de cepas probióticas deve ter um respaldo científico, higiênico e tecnológico (FARNWORTH, 2008), caso do gênero *Lactobacillus* que é considerado GRAS - *generally reconized as safe* (geralmente reconhecido como seguro) e em especial o *L. casei* que tem sido amplamente estudado para

emprego em alimentos industrializados e tem se mostrado viável para a produção de bebidas vegetais (SHEEHAN et al., 2007; CÉSPEDES et al., 2013).

Em vistas ao desenvolvimento de produtos com excelência nutricional e boa capacidade funcional, além de contribuir para o desenvolvimento da economia nordestina, o objetivo desta tese foi de elaborar bebidas funcionais à base de matérias primas regionais de boa aceitação e baixo custo, sugerindo que a combinação de alimentos regionais de viabilidade tecnológica, associados a um micro-organismo de segurança alimentar e reconhecidas características funcionais deva ser capaz de produzir bebidas vegetais tecnologicamente viáveis e nutricionalmente atraentes.

O desenvolvimento desta tese originou 4 artigos, sendo um de revisão e três originais:

Artigo de Revisão:

- “Inhame (*Dioscorea sp.*): alimento funcional em potencial”

Artigos originais:

- “Functional beverage of Passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) and Yam (*Dioscorea cayennensis*) fermented with *Lactobacillus casei*”
- “Development and characterization of functional beverage of Pineapple (*Ananas comosus L. Merrill*) and Yam (*Dioscorea cayennensis*) fermented with *Lactobacillus casei*”
- “Functional Mango (*Mangifera indica L.*) and Yam (*Dioscorea cayennensis*) beverage fermented with *Lactobacillus casei*”.

Os dados relativos à produção e caracterização da Farinha de Inhame (FI) desenvolvida neste estudo serão direcionados para o processo de reconhecimento de patente e estão relatados na primeira parte dos resultados desta tese. Em face da não exposição dos dados, apenas após o término do tramite de reconhecimento de patente os resultados serão direcionados para a elaboração de mais um artigo.

Hipótesis

2. HIPÓTESES

- O inhame (*Dioscorea cayennensis*) é uma matéria prima viável para uso tecnológico, servindo como substrato na produção de bebidas funcionais à base de frutos tropicais e *L. casei*.
- O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), a manga (*Mangifera indica* L.) e o maracujá (*Passiflora edulis* Sims), enriquecidos com a FI, são frutos viáveis para a elaboração de bebidas funcionais fermentadas com *L. casei*.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial tecnológico da farinha de inhame para utilização na elaboração de bebidas funcionais à base de frutos tropicais e *L. casei* subsp. *paracasei*.

3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar e caracterizar a farinha de inhame.
- Desenvolver bebidas funcionais à base de frutos tropicais adicionadas da farinha de inhame e fermentá-las com *L. casei*.
- Determinar a composição centesimal, estabilidade microbiológica e perfil sensorial das bebidas elaboradas.
- Avaliar a estabilidade microbiológica e variação de pH das bebidas ao longo do tempo de armazenamento de 28 dias.
- Verificar a sobrevivência do *L. casei* à passagem pelo trato gastrointestinal humano, por simulação in vitro, nos tempos 0 e 28 dias de armazenamento das bebidas.

Revisão da literatura

4. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão da literatura está dividida em duas partes. O artigo de revisão intitulado: “**Inhame (*Dioscorea sp.*): alimento funcional em potencial**” aborda aspectos relevantes sobre o inhame e suas propriedades funcionais. O mesmo foi submetido para avaliação pela Revista Ciência Rural (Qualis B2 – Nutrição – Anexo 1).

A segunda parte da revisão trás os demais aspectos relevantes para a elaboração desta tese no formato de capítulos, como exigido pelo Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1 Artigo de revisão

Artigo submetido à revista **Ciência Rural** (Anexo 1)

Título: Inhame (*Dioscorea sp.*): alimento funcional em potencial

Qualis (nutrição): B2

Título:**INHAME (*Dioscorea sp.*): ALIMENTO FUNCIONAL EM POTENCIAL****YAM (*Dioscorea sp.*): POTENTIAL FUNCTIONAL FOOD****Autores:**Cinthia Karla Rodrigues do **Monte-Guedes**^{*a}Thayza Christina Montenegro **Stamford**^bTânia Lúcia Montenegro **Stamford**^c^{*}Autor correspondente (endereço no rodapé)

a – Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – Maceió – AL – Brasil

b - Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Recife – PE – Brasil

c - Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Recife – PE – Brasil

Endereço: Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária - CEP: 57072-900 - Maceió-AL, Brasil.

Telefone: +55-82-32141145/ 81-92116846

e-mail: ckrvasconcelos@gmail.com ou ckrodrigues@hotmail.com

RESUMO

O Inhame é um tubérculo com características alimentares importantes, sendo tradicionalmente produzido e consumido na África e no Brasil. Ele tem sido usado, dentre outros fins, como aditivo nutricional a fim de adicionar propriedades funcionais às preparações. Seu uso para fins medicinais é relatado desde a década de 50. Estudos recentes apontam uma diversidade de propriedades relacionadas ao consumo do tubérculo ou de seus compostos isolados, tais como ação imunomoduladora, antioxidante e anti-inflamatória, além de exercer papel modulador na absorção e metabolismo dos lipídios e da glicose e de ser usado no tratamento e prevenção da menopausa, do câncer e da hipertensão. Apesar de tantos benefícios apontados poucos investimentos para subsidiar o aumento de sua produtividade e aplicabilidade têm sido realizados.

Palavras-chave: Inhame (*Dioscorea sp.*), Alimento funcional.

ABSTRACT

Yam is a tuber with important food characteristics, being traditionally produced and consumed in Africa and Brazil. It has been used, among other purposes, such as nutritional additive to add functional properties to preparations. Its use for medicinal purposes has been reported since the 50s. Recent studies suggest a variety of consumer-related tuber or of this isolated compounds, such as immunomodulatory, antioxidant and anti-inflammatory activity and exert modulatory role in absorption and metabolism of lipids and glucose and be used in the treatment menopause and prevention of cancer and hypertension. Despite many benefits pointed few investments to support increased productivity and applicability have been conducted.

Key words: Yam (*Dioscorea sp.*), Functional food.

Inhame (*Dioscorea* sp.)

Dioscorea sp. pertence à família *Dioscoreaceae*, que possui caule herbáceo e escandente (trepador), é caracterizada por formar tubérculos. Dentre as mais importantes encontram-se *D. rotundata*, *D. alata*, *D. trifida*, *D. esculenta* e *D. cayennensis*. A *Dioscorea cayennensis* Lam. é uma videira caracterizada pelo formato cilíndrico e coloração amarelada. É conhecida mundialmente como “yellow guinea yam” ou “twelve months yam”, mas no Brasil é denominado Inhame-da-Costa ou simplesmente Inhame (IN) (PURSEGLOVE, 1975; FAO, 2013; USDA, 2013).

O IN apresenta características alimentares importantes. A análise de sua composição evidencia tratar-se de um alimento rico em carboidratos, tendo, portanto, um excelente valor energético. Apresenta ainda bom teor de fibras e baixo índice glicêmico (37 ± 8), além de ser fonte de minerais como o cálcio, magnésio e potássio além de vitamina C (Tabela 1) (FOSTER-POWELL et al., 2002; BRASIL, 2010).

INSERIR TABELA 1

Historicamente o IN é usado na culinária africana e brasileira. Trazidos para o Brasil pelos Portugueses no século XVI, o tubérculo era usado em preparações doces como manjares e salgadas como caldos além de serem consumidos com carnes. No mundo o túbero é comumente utilizado na forma cozida, assada ou no preparo de purês e saladas (HUE et al., 2008; FAO, 2013). A farinha pode ser obtida do IN *in natura* ou macerado e é usada para o preparo de massas (amala), papas e para adição em outros alimentos, conferindo-lhes melhor aporte nutritivo além de propriedades funcionais (LAUDAN, 1997; MESTRES et al., 2004).

O IN continua sendo tradicionalmente produzido nos Países Africanos, essencialmente no oeste da África, sendo mais consumido na Nigéria e na Costa do Marfim. O continente

lidera com 93% da produção global do tubérculo (ASIEDU, 2010; FAO, 2013). Entretanto, sua cultura também é de extrema importância para o Brasil, que produz quase 100 mil toneladas do tubérculo por ano (Figura 1), com destaque para as Regiões Sudeste e Nordeste (IBGE, 2009).

Dados do Censo Agropecuário Brasileiro do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam que apenas o sudeste é responsável por quase 56% da produção total do País, entretanto o Nordeste brasileiro vem ascendendo, sendo responsável por uma produção que gira em torno de 39 mil toneladas por ano, já alcançando pouco mais de 38% da produção do país. A espécie predominantemente cultivada é a *Dioscorea cayennensis* (IBGE, 2009).

A produção total de IN no Brasil já movimentava mais de 76,5 milhões de reais no ano de 2006. Segundo a FAO, em 2012 a produção girou em torno de 246 mil toneladas por ano. Os dados evidenciados demonstram, portanto, que a cultura do IN é um negócio agrícola promissor, visto ainda a perspectiva de exportação, que em 2006 englobava menos de 0,5% da produção total do país (IBGE, 2009; FAO, 2014).

INSERIR FIGURA 1

Investimentos para subsidiar o aumento da produtividade do IN e da sua aplicabilidade, seja na forma de subprodutos ou como matéria prima industrial, justifica-se pela perspectiva econômica. Atualmente o cultivo do IN movimenta quase 77 milhões de reais por ano no Brasil, entretanto menos que 0,02% da produção (19 toneladas) é usada para transformação ou beneficiamento (IBGE, 2009).

Estudos remotos e atuais evidenciam que o IN é uma excelente matéria prima, tanto sob aspectos nutricionais, sendo considerado um tubérculo de qualidade superior quando

comparado aos demais (WANASUNDERA; RAVINDRAN, 1994), quanto como matéria prima promissora no emprego industrial (KIM et al., 2011; SHITTU; OLAITAN, 2014) e ainda como alimento funcional.

Atribuições funcionais

Desde tempos remotos, na China antiga, o tubérculo do IN é utilizado para fins medicinais, com promessas de melhorar o funcionamento sistêmico e de ser benéfico no tratamento de algumas doenças (LI, 1956). Diversas funções são atribuídas ao tubérculo, e com o intuito de verificar se as atribuições possuem fundamento, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos.

Evidências reportam a dioscorina, uma proteína de estocagem presente no IN, como componente funcional com atividade imunomoduladora (HOOKER, 2004; JHENG et al., 2012). Estudo de Lin et al. (2009), investigando a ação da dioscorina extraída de diferentes espécies de IN (*Dioscorea alata* e *Dioscorea japonica*) sobre as atividades do sistema imunológico de ratos, evidenciaram que as dioscorinas de ambas as espécies levaram ao aumento da fagocitose de células RAW 264.7, sendo melhor para a *D. alata*. O aumento da proliferação de células linfóides também foi evidenciado, entretanto a *D. japonica* apresentou maior capacidade de estimulação que a *D. alata*. Testes in vivo após ingestão do IN evidenciaram um efeito modulador tanto à nível de mucosa, quanto sistêmico (LIU et al, 2009a).

Hou et al. (2001) estudando a capacidade antioxidante da dioscorina extraída da *Dioscorea alata* L. sugeriram que a proteína possa desempenhar papel antioxidante nos tubérculos e que possivelmente seria benéfica para a saúde humana se aplicada em quantidades adequadas como aditivo alimentar. O uso da mucilagem do IN (*Dioscorea*

batatas) também evidenciou efeito neutralizador de radicais livres (HOU et al., 2002). Outros estudos evidenciam o mesmo efeito (HAN et al., 2013; HSU et al., 2013a).

O efeito antioxidante do IN também tem sido associado à presença de flavonóides em sua composição. Estudo de Jayachandran et al. (2010) consistiu em observar se a fração rica em flavonóides (FRF) do *Dioscorea bulbifera* Linn. era capaz de exercer efeito protetor em ratos frente à agressão provocada pelo isoproterenol (ISO), fármaco usado como modelo para indução de infarto do miocárdio (IM). Os resultados do estudo evidenciaram que a administração da FRF na proporção de 150mg/kg, 35 dias antes da agressão com o ISO, foi eficiente na modulação da peroxidação lipídica provocada pelo IM, diminuindo os radicais livres e melhorando o status das enzimas mitocondriais de energia, sugerindo um forte efeito protetor da FRF do IN contra danos cardiovasculares.

O papel do IN (*Dioscorea bulbifera*) frente à injúria provocada pela isquemia e reperfusão miocárdicas também foi avaliado. 1 ml de solução contendo 150mg/Kg de extrato alcoólico de IN era administrado por gavagem diariamente por 30 dias aos animais. Após o tempo de pré-tratamento os animais foram sacrificados e as injúrias de isquemia e reperfusão simuladas. Foi observada melhora da função ventricular e diminuição da necrose no miocárdio e da apoptose celular nos animais tratados com o IN. Os dados sugerem que o IN pode ser usado para extração de fármacos para este fim (Vasanthi et al., 2010).

Devido ao efeito antiinflamatório apresentado pela dioscorina, sua utilização foi testada na proteção das *tight junctions* do epitélio brônquico (TJB) contra a exposição a extrato de ácaro, que apresenta efeito alergênico além de ser um agente responsável pela destruição das TJB. O experimento *in vitro* evidenciou proteção da expressão de proteínas nas TJB de células A549, sugerindo que a dioscorina seja potencial protetor das TJB frente a danos causados por ácaros (FU et al., 2009). Corroborando com estes achados, a supressão da reação alérgica em ratos sensibilizados à ovoalbumina foi evidenciada através da modulação da

resposta imunológica mediada pela dioscina extraída da *D. alata* (HSU, 2013b). Estudo de Chiu et al. (2013) reforça o potencial efeito antiinflamatório e antioxidante da *Discoreaceae*.

Estudo placebo controlado e randomizado realizado com pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) nos estágios de moderada à severa analisou o efeito do tratamento farmacológico com uma mistura feita com 30 g de ShanYao (*Dioscorea opposita*) e 12 g de Xian-LingPi (Erva Epimedii) quanto à melhoria da sintomatologia da doença e na qualidade de vida dos pacientes. Os resultados evidenciaram que àqueles tratados com a mistura apresentaram melhora significativa na dispneia, na capacidade de exercício e na qualidade de vida, quando comparados ao controle, enfatizando um excelente efeito farmacológico das matérias primas utilizadas no tratamento da DPOC (Zhao et al., 2012).

O uso do extrato aquoso do IN (*Dioscorea alata* L.) no tratamento da hepato e nefro toxicidades foi observado em ratos submetidos à toxicidade aguda por acetaminofeno (paracetamol). Doses de 500 e 1.000 mg/kg do extrato eram administradas frente aos controles e se mostraram eficazes na melhoria das alterações tubulares observadas no rim e ainda protegeram o fígado da inflamação e da necrose provocadas pela exposição (LEE et al., 2002a; LEE et al, 2002b). Em contraste, estudo realizado por Wojcikowski et al. (2008) com administração de 0,79g/Kg/dia de extrato de IN (*Dioscorea villosa*) por 7, 14 ou 21 dias, evidenciou um aumento na fibrose renal, entretanto não foi constatada a ocorrência de toxicidade aguda renal ou hepática.

A análise das pesquisas sugere que o benefício do IN é dependente da dosagem e do seu tempo de uso. Estudo posterior realizado por Chan et al. (2010) corrobora com esta hipótese, uma vez que observou que a administração do IN atenuou, de maneira dose-dependente, a fibrose hepática induzida farmacologicamente por tetracloreto de carbono. O estudo sugere que a ação benéfica do IN esteja ligada às propriedades antioxidantes atribuídas

ao tubérculo. Estudo de Liu et al. (2012) também evidenciou o IN (*Dioscorea alata*) como agente antagonista da fibrose renal.

O IN também tem sido apontado como ingrediente modulador da morfologia intestinal e da absorção de lipídios. Estudo de Chen et al. (2003) apontou efeito positivo da suplementação da *Dioscorea japonica* na dieta de ratos adultos nas proporções de 25 e 50% quanto à diminuição da largura entre as vilosidades gástricas. As dietas também foram eficazes na melhoria da borda em escova do intestino delgado, como aumento de 30% da atividade da leucina aminopeptidase para ambas as dietas e diminuição da atividade da sacarase em 40 e 50% para as dietas com 25 e 50% de IN, respectivamente. Tais alterações refletiram positivamente no perfil de colesterol plasmático e hepático dos animais, com diminuição da fração LDL (*low density lipoprotein*) do colesterol. Muito provavelmente tal efeito se deveu a uma menor absorção de lipídios no intestino dos animais.

Estudo de Nishimura et al. (2011) com o IN chinês (*Dioscorea opposita*) corrobora com estes achados, indicando ainda que o IN cru em detrimento do cozido seria uma melhor fonte de amido resistente (39,9g/100g e 6,9g/100g respectivamente no IN cru e cozido) e quando suplementado na dieta de animais na proporção de 30% facilitaria a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente o butirato, atuando também na diminuição do colesterol plasmático, muito provavelmente pela inibição da liberação VLDL.

Estudo realizado em 2006 por Jeon et al. para avaliação do efeito farmacológico do extrato alcoólico da farinha de IN chinês (*Dioscorea rhizoma*), que continha aproximadamente 177 ± 58 mg/ml de dioscina, no trato gastrointestinal ne ratos *Sprague-Dawley* demonstrou que houve uma supressão da secreção de ácido clorídrico pelo estômago, um aumento na motilidade intestinal na ordem de 10%, além de aumento no volume fecal superior a 40% naqueles que consumiram o IN. O consumo prolongado por 6 semanas de dieta contendo 2% do extrato ainda elevou o número de bactérias lácticas encontradas nas

fezes dos animais, sugerindo um incremento na flora intestinal benéfica. As concentrações séricas de colesterol, lipídios totais e de glicose foram menores nos animais com uso de IN quando comparadas ao controle.

O efeito antiobesidade também vem sendo associado ao IN. Estudo de Xiao et al. (2010) a fim de esclarecer os mecanismos de ação do tubérculo frente à esta associação utilizou a Pseudoprotodioscina (PPD), uma saponina esteroidal extraída do *Dioscorea nipponica makino* e verificou sua relação com receptores de estrógeno (RE), uma vez que esses receptores estão intimamente ligados à adipogênese. O estudo verificou, tanto *in vitro* como *in vivo*, que o tratamento com PPD foi eficaz na diminuição da adipogênese, de forma significativa. A diminuição da expressão gênica da lipoproteína lipase e da leptina, genes envolvidos na adipogênese, também foi verificada e foi estabelecida uma relação de dependência do efeito antiadipogênico com os RE. Recente estudo de Yang et al. (2014) demonstrou que compostos fenólicos derivados do IN Coreano (*Dioscorea opposita*) apresentaram atividade inibitória da lipase pancreática, contribuindo com a hipótese de que o IN é eficaz na diminuição da absorção de lipídios no intestino.

Corroborando com esses achados, estudo desenvolvido por Omomuyi et al. (2008) constatou o aumento na excreção lipídica em ratos *Wistar* com diabetes induzida por estreptozotocina, tratados tanto com extrato de IN amargo (*Dioscorea polygonoides*) quanto com diogenina comercial. Efeito hipoglicemiante e modulação do estresse oxidativo também foram observados frente à suplementação (0,1 e 0,5%) de diosgenina, uma saponina esteroidal do IN, na vigência do consumo de uma dieta rica em colesterol por ratos (SON et al., 2007). A administração de alantoína, um princípio ativo do IN (*Dioscorea spp.*) pertencente ao grupo dos derivados de guanidina, também se mostrou eficaz na diminuição da glicemia, de maneira dose dependente, o que possivelmente ocorreu pelo aumento da expressão do gene GLUT4 (NIU et al. 2010) ou pela ativação de receptores de imidazolina I-2B (CHEN et al., 2012).

A suplementação de extrato de sapogenina extraído do IN amargo ou de diogenina comercial administrados em ratos diabéticos foi eficaz na modificação do metabolismo da glicose, levando a uma diminuição na sua concentração plasmática, sugerindo um efeito hipoglicemiante do tubérculo (MCANUFF et al., 2005; OMORUYI, 2008). Estudo posterior relatou efeito modulador do IN no metabolismo na glicose em ratos, tanto na regulação da glicemia sanguínea pós pandrial, quanto nos níveis de insulina, que se mostrou mais baixo após 30 e 60 minutos do consumo de dieta experimental com 20% de IN. O consumo prolongado de uma dieta contendo 15% de IN também evidenciou melhor resposta à curva glicêmica e níveis menores de hemoglobina glicosilada quando comparados ao controle (HASHIMOTO et al, 2009).

Folcloricamente o IN também é usado no tratamento da menopausa. Um estudo com 22 mulheres pós-menopáusicas foi realizado para verificar se a suplementação do tubérculo na dieta (390g em 2 refeições diárias por 30 dias) era capaz de interferir nos níveis séricos de hormônios sexuais. Foi evidenciado um expressivo aumento tanto nos níveis de estrógeno (26%) quanto no de estradiol (27%) (WU et al., 2005). Apesar de novas substâncias com atividade estrogênica terem sido identificadas no IN (CHENG et al, 2007), Hsu et al. (2008) sugerem que a ação estrogênica esteja associada ao consumo do alimento integral e não de compostos específicos.

A diosgenina é reportada por estimular a osteogênese. Estudo in vitro com cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1 tratadas com diosgenina da concentração de 0-10 μ M por 25 dias evidenciou que houve aumento na expressão de colágeno tipo I, da fosfatase alcalina, do fator de transcrição específico para ossos Runx2 e da osteopontina. Esse aumento pode levar a uma maior formação de depósitos de cálcio, que por sua vez leva ao aumento da formação óssea, evidenciando que a diosgenina estimula a atividade osteogênica (ALCANTARA et al. 2011).

Park et al. (2009) evidenciaram que o uso do extrato de IN selvagem atuou como um fitoestrógeno fraco que foi capaz de inibir a proliferação *in vitro* de células MCF-7 do câncer de mama humano. Em acréscimo, Mazzio e Soliman (2009) investigaram o potencial antitumoral de 374 extratos naturais usando uma metodologia de efeito dose-dependente numa concentração que variou de 10 µg/ml até 5 mg/ml. Os resultados demonstraram que muitos extratos usados exerciam efeito tumoricida relativamente fraco, entretanto algumas plantas demonstraram um potente efeito, como o IN selvagem (*Dioscorea villosa*). Estudo realizado por Mazzio et al. (2013) incrementa a evidência anterior, mostrando que o IN exerce ainda um efeito anti-mitótico em células MDA-MB-231 do câncer de mama humano. A proteção do IN selvagem contra cânceres ginecológicos foi recentemente reportada (DEPYPERE; COMHAIRE, 2014).

O uso do Sanyaku, um pó de IN preparado tradicionalmente pela medicina chinesa, se mostrou eficaz na quimioprevenção em ratos com câncer de cólon induzido por azoximetano e dextrano sulfato de sódio. O preparado que continha $63,8 \pm 1,2$ mg/Kg de diosgenina, foi comparado com a diosgenina comercial e nenhuma diferença na prevenção foi encontrada, sugerindo que o consumo do Sanyaku ou de qualquer tubérculo com uma boa concentração de diosgenina seja eficaz na prevenção contra a câncer de cólon (MIYOSHI et al., 2011).

Chiu et al. em 2009 testaram a capacidade neuroprotetora do IN através de uma manipulação dietética em ratos com senescência induzida por D-galactose. Doses de 20, 100 e 500 mg/ Kg do extrato de IN (contendo 5,49 mg/g de dioscorina) foram administradas por 6 semanas nos animais. Em seguida a capacidade de aprendizagem e memória foi avaliada através do labirinto aquático de Morris. Os resultados demonstraram que os animais tratados com o IN possuíam uma maior capacidade de aprendizagem e memorização quando comparados com o controle (D-galactose - 200mg/Kg). Esse dado sugere que o IN seria benéfico no tratamento de prejuízos cognitivos através de metabolismo antioxidativo.

A função da dioscorina na inibição da Enzima Conversora de Angiotensina também foi estudada por Hsu et al. (2002). Sabidamente os inibidores de angiotensina são capazes de prevenir a estimulação da aldosterona pela inibição da conversão de angiotensina I a angiotensina II, levando a uma maior excreção de sódio e água pelos rins, inibindo a ocorrência de hipertensão. O estudo observou uma relação positiva desta inibição, sugerindo que o consumo do tubérculo seja uma forma natural de prevenir a hipertensão. Estudo posterior confirma esta hipótese (NAGAI; NAGASHIMA, 2006).

A fim de verificar se o efeito antihipertensivo atribuído ao IN era mantido frente a diferentes tratamentos passíveis ao tubérculo, estudo de Liu et al. (2009b) verificou que tanto na forma de produtos líquidos (extrato aquoso à 90 ou 95°C) quanto de produtos sólidos (fatias de IN secas à quente, previamente cozinhadas ou não à vapor) o IN manteve sua eficácia na redução da pressão sanguínea de ratos espontaneamente hipertensos. Os autores concluem o estudo estimulando o desenvolvimento de alimentos funcionais com o IN a fim de regular a pressão arterial.

Estudos pontuais começam a mostrar o uso de IN para outros delineamentos. A propriedade anti-viral da dioscina foi testada com excelente resultados, especialmente para o bloqueio da fase inicial da infecção por adenovírus e ainda interferiu positivamente na resposta celular do hospedeiro (LIU et al., 2013).

Frente à diversidade de funções atribuídas ao tubérculo e aos seus componentes isolados e através da observação de que apesar do processamento de nanopartículas melhorar a disponibilidade de alguns compostos, isso não tenha sido observado para o IN (PAN et al, 2013), supostamente a melhor forma de uso do tubérculo para o consumo profilático e para o tratamento de alguns acometimentos à saúde seja através de sua forma *in natura* ou com processamento limitado.

Considerações finais

A cultura do IN ainda tem sido bastante negligenciada (SIQUEIRA, 2011), entretanto mesmo com a realização de poucos estudos ele tem mostrado características alimentares e funcionais importantes, sendo um alimento promissor tanto no incremento da economia Brasileira quanto para compor o cenário dos alimentos funcionais. Melhorar o embasamento científico visando um melhor e maior aproveitamento do IN, além de considerar a utilização da matéria prima para os citados e outros fins é um desafio para aqueles que fazem ciência.

Referências

- ALCANTARA E.H. et al. Diosgenin stimulates osteogenic activity by increasing bone matrix protein synthesis and bone-specific transcription factor Runx2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n.11, p.1055-63, 2011.
- ASIEDU R.S.A. Crops that feed the World. Yams: Yams for income a foodsecurity. **Food security**, v. 2, p.305-15, 2010.
- BRASIL. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília, 2010. Capturado em 20 fev. 2014. Online. Disponível na Internet: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Qualidade/Qualidade%20dos%20Alimentos/Cartilha%20Hortali%C3%A7as_ao-convencionais.pdf.
- CHAN Y.C. et al. Beneficial effects of yam on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.15, n.90(1), p.161-7, 2010.
- CHEN H. et al. Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica Thunb var. pseudojaponica Yamamoto*) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. **Nutrition**, v.19, n.7-8, p.646-51, 2003.
- CHEN M.F. et al. Activation of imidazoline I-2B receptors by allantoin to increase glucose uptake into C₂C₁₂ cells. **Hormone and Metabolic Research**, v.44, n.4, p.268-72, 2012.
- CHENG W.Y. et al. Isolation and identification of novel estrogenic compounds in yam tuber (*Dioscorea alata Cv. Tainung No. 2*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.5, n.55(18), p.7350-8, 2007.
- CHIU C.S. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica Thunb. var. pseudojaponica* (Hayata) Yamam.) and its reference compounds. **Food Chemistry**, v.15, n.141(2), p.1087-96, 2013.

CHIU C.S. et al. Yam (*Dioscorea pseudojaponica Yamamoto*) ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.37(5), p.889-902, 2009.

DEPYPERE H.T., COMHAIRE F.H. Herbal preparations for the menopause: Beyond isoflavones and black cohosh. **Maturitas**, v.77(2), p.191-4, 2014.

FAO - Food and Agriculture Organization. *Dioscorea cayenensis*. 2013. Acessado em 12 fev. 2014. Online. Disponível em: <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=5369>.

FAO- Food and Agriculture Organization. **Food and Agricultural commodities production-Yam**. 2014. Acessado em 22 jan. 2014. Online. Disponível em: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en>.

FOSTER-POWELL K, et al. International table of glycemic index and glycemic load values. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.76(1), p. 55-56, 2002.

FU L.S. et al. Dioscorin protects tight junction protein expression in A549 human airway epithelium cells from dust mite damage. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.42(6), p.457-63, 2009.

HAN C.H. et al. Antioxidant activities of the synthesized thiol-contained peptides derived from computer-aided pepsin hydrolysis of yam tuber storage protein, dioscorin. **Food Chemistry**, v.138, p.923-30, 2013.

HASHIMOTO N. et al. Yam contributes to improvement of glucose metabolism in rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.64(3), p.193-8, 2009.

HOOKER E. Final report of the amended safety assessment of *Dioscorea villosa* (wild yam) root extract. **International Journal of Toxicology**, v.23, p.49-54, 2004.

HOU W.C. et al. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas Decne*) tuber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49(10), p.4956-60, 2001.

HOU WC et al. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. **Planta medica**, v. 68, n.12, p.1072-6, 2002.

HSU F.L. et al. Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. *Tainong No. 1*), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.9, n.50(21), p.6109-13, 2002.

HSU J.Y. et al. Dioscorin pre-treatment protects A549 human airway epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. **Inflammation**, v.36(5), p.1013-9, 2013a.

HSU J.Y. et al. Suppression of allergic reactions in ovalbumin-sensitized mice by yam storage proteins dioscorins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.61(47), p.11460-7, 2013b.

HSU K.H. et al. Effects of yam and diosgenin on calpain systems in skeletal muscle of ovariectomized rats. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.7(2), p.180-6, 2008.

HUE S.M. et al. **Delícias do descobrimento: a gastronomia brasileira no século XVI**. Jorge Zahar ed. Rio de Janeiro, 2008, 208p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006 - Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Rio de Janeiro, 2009. Capturado em 20 fev. 2014. Online. Disponível na Internet: http://biblioteca.ibge.gov.br/d_detalhes.php?id=751.

JAYACHANDRAN KS et al. Flavonoid rich fraction of *Dioscorea bulbifera* Linn. (Yam) enhances mitochondrial enzymes and antioxidant status and thereby protects heart from isoproterenol induced myocardial infarction. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.11, n.8, p.887-94, 2010.

JEON J.R. et al. Effect of ethanol extract of dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. **Archives of Pharmacal Research**, v.29, n.5, p.348-53, 2006.

- JHENG Y.J. et al. Recombinant dioscorins of the yam storage protein expressed in *Escherichia coli* exhibit antioxidant and immunomodulatory activities. **Protein Expression and Purification**, v.85, n.1, p.77-85, 2012.
- KIM S.H. et al. Effect of *Dioscorea opposita Thunb.* (yam) supplementation on physicochemical and sensory characteristics of yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.4, p.1705-12, 2011 doi: 10.3168/jds.2010-3918.
- LAUDAN R. **The Food of Paradise: Exploring Hawaii's Culinary Heritage**. University of Hawaii Press. Hawaii, 1997.
- LEE S.C. et al. Effects of "Chinese yam" on hepato-nephrotoxicity of acetaminophen in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.23, n.6, p.503-8, 2002a
- LEE S.C. et al. The evaluation of reno- and hepatoprotective effects of huai-shan-yao (*Rhizome Dioscoreae*). **The American Journal of Chinese Medicine**, v.30, n.4, p.609-16, 2002b
- LI S.C. **Pen-T'sao Kang Mu** (Systematic Pharmacopoeia), Nanjing, China, 1956.
- LIN P.L. et al. Yam storage protein dioscorins from *Dioscorea alata* and *Dioscorea japonica* exhibit distinct immunomodulatory activities in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.10, n.57(11), p.4606-13, 2009. doi: 10.1021/jf8038499
- LIU C. et al. Dioscin's antiviral effect in vitro. **Virus Research**, v.172, n.1-2, p.9-14, 2013.
- LIU S.F. et al. *Dioscorea alata* attenuates renal interstitial cellular fibrosis by regulating Smad- and epithelial-mesenchymal transition signaling pathways. **Plos One**, v.7, n.11, p.474-82, 2012.
- LIU Y.H. et al. Effects of different types of yam (*Dioscorea alata*) products on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v.73, n.6, p.1371-6, 2009b

- LIU Y.H. et al. Effects of oral administration of yam tuber storage protein, dioscorin, to BALB/c mice for 21-days on immune responses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.14, n.57(19), p.9274-9, 2009a. doi: 10.1021/jf902245k.
- MAZZIO E. et al. High Throughput Screening of Natural Products for Anti-mitotic Effects in MDA-MB-231 Human Breast Carcinoma Cells. **Phytotherapy Research**, v.17, 2013. doi: 10.1002/ptr.5065
- MAZZIO E.A.; SOLIMAN K.F. In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. **Phytotherapy Research**, v.23, n.3, p.385-98, 2009. doi: 10.1002/ptr.2636.
- MCANUFF M.A. et al. Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, n.11, p.1667-72, 2005.
- MESTRES C. et al. Prediction of sensorial properties (color and taste) of amala, a paste from yam chips flour of West Africa, through flour biochemical properties. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.59, n.3, p.93-99, 2004
- MIYOSHI N. et al. Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam sanyaku and its constituent diosgenin. **Cancer Prevention Research**, v.4, n.6, p.924-34, 2011. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0279.
- NAGAI T., NAGASHIMA T. Functional properties of dioscorin, a soluble viscous protein from Japanese yam (*Dioscorea opposita thunb.*) tuber mucilage Tororo. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.61, n.11-12, p.792-8, 2006.
- NISHIMURA N. et al. Raw Chinese yam (*Dioscorea opposita*) promotes cecal fermentation and reduces plasma non-HDL cholesterol concentration in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.57, n.5, p.340-7, 2011.

NIU C.S. et al. Decrease of plasma glucose by allantoin, an active principle of yam (*Dioscorea spp.*), in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.24, n. 58(22), p.12031-5, 2010. doi: 10.1021/jf103234d.

OMORUYI F.O. Jamaican bitter yam sapogenin: potential mechanisms of action in diabetes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.63, n.3, p.135-40, 2008. doi: 10.1007/s11130-008-0082-z.

PAN C.H. et al. Influence of different particle processing on hypocholesterolemic and antiatherogenic activities of yam (*Dioscorea pseudojaponica*) in cholesterol-fed rabbit model. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.6, p.1278-83, 2013.

PARK M.K. et al. Estrogen activities and the cellular effects of natural progesterone from wild yam extract in mcf-7 human breast cancer cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.37, n.1, p.159-67, 2009.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops: monocotyledons**. New York: J. Wiley & Sons, 1975.

SHITTU T.A., OLAITAN O.F. Functional effects of dried okra powder on reconstituted dried yam flake and sensory properties of ojojo-a fried yam (*Dioscorea alata L.*) snack **Journal of Food Science and Technology**, v.51, n.2, p.359-64, 2014 doi: 10.1007/s13197-011-0513-y.

SIQUEIRA M.V.B.M. Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, v.29, n.1, p.16-25, 2011.

SON I.S. et al. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea spp.*), on high-cholesterol fed rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v.71, p.3063–71, 2007

USDA, **Germplasm Resources Information Network - (GRIN)** [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, 2013. Acessado em 12 out. 2013. Online. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?14189>

VASANTHI H.R. et al. Protective role of air potato (*Dioscorea bulbifera*) of yam family in myocardial ischemic reperfusion injury. **Food Function**, v.1, n. 3, p.278-83, 2010. doi: 10.1039/c0fo00048e.

WANASUNDERA J.P., RAVINDRAN G. Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.46, n.1, p.33-9, 1994

WOJCIKOWSKI K. et al. *Dioscorea villosa* (wild yam) induces chronic kidney injury via pro-fibrotic pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.9, p.3122-31, 2008. doi: 10.1016/j.fct.2008.06.090.

WU W.H. et al. Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women **Journal of the American College of Nutrition**, v.24, n.4, p.235-43, 2005.

XIAO J. et al. Estrogen receptor mediates the effects of pseudoprotodiocsin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.299, n.1, p.C128-38, 2010.

YANG M.H. et al. Phenolic compounds with pancreatic lipase inhibitory activity from Korean yam (*Dioscorea opposita*). **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n.1, p.1-6, 2014. doi: 10.3109/14756366.2012.742517

ZHAO Y.L. et al. The effects of Chinese yam-epimedium mixture on respiratory function and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v.32, n.2, p.203-7, 2012.

Tabela 1: Composição centesimal do inhame (*Dioscorea sp.*)

ANÁLISES	INHAME	
	<i>Dioscorea sp.</i> ^A	<i>Dioscorea alata</i> ^{BC}
Umidade (%)	65,62	76,8
Energia (Kcal/ KJ)	137,98/ 576,76	105,56 ^D / 441,24
Proteína (g)	3,06	1,77
Lipídeos (g)	0,86	0,08
Carboidrato (g)	29,5	24,44
Fibra alimentar (g)	-	0,75
Cinzas (g)	0,96	0,86

^ABRITO *et al.*, 2011; ^BPAULA *et al.*, 2012; ^CConvertido para base úmida;

^DCalculado pelos autores.

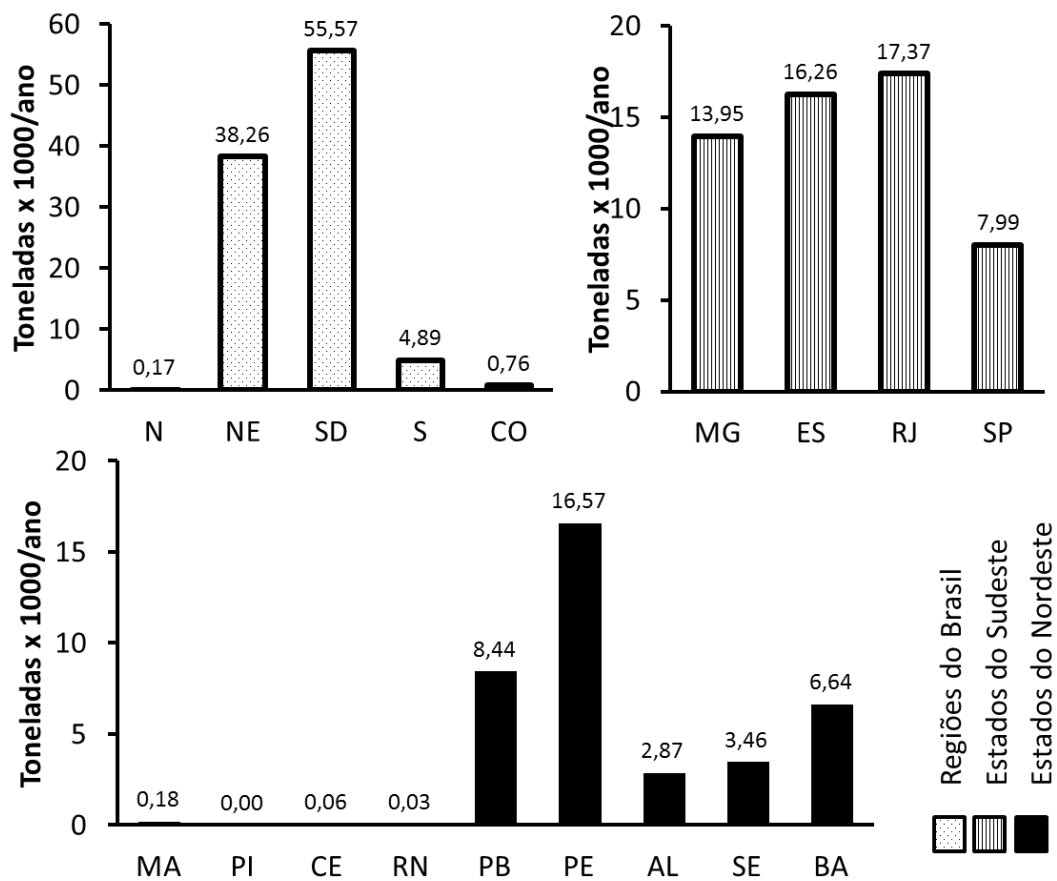


Figura 1: Produção de Inhamé (*Dioscorea sp.*) no Brasil e nas Regiões Sudeste e Nordeste no ano de 2006. Fonte: adaptado do Censo Agropecuário 2006 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009). Nota: a produção do Estado do Piauí está representada como zero, uma vez que é desconsiderada no censo de 2006 do IBGE.

4.2 Alimentos funcionais

Atualmente a escolha alimentar transpôs a barreira do sabor e aceitabilidade. Com o avanço científico-tecnológico e com a constatação de benefícios à saúde trazidos por determinados grupos de alimentos, os consumidores tem feito de suas escolhas um estilo de vida em prol da saúde e bem-estar (KANMANI et al., 2013).

Diante desta nova perspectiva, a biotecnologia tem se ocupado em desenvolver produtos que possuam além das características básicas da nutrição, como a presença de macro e micronutrientes, propriedades funcionais para a prevenção ou tratamento de acometimentos à saúde, inibindo a instalação de algumas doenças. Esta nova visão possibilita o desenvolvimento de novos ingredientes/ produtos com características desejáveis (MEIRA et al., 2012).

A resolução nº 2 de 07 de janeiro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde que define alimento funcional como "todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica", também suporta o desenvolvimento de novos produtos alimentícios que contenham constituintes bioativos em sua composição, tornando-se fonte dos mesmos (ANVISA, 2008).

O objetivo central do acréscimo de alimentos funcionais na alimentação é restaurar, reforçar e manter a saúde dos consumidores (ROBERFROID, 2002). O mercado dos alimentos funcionais tem se mostrado promissor e rentável, uma vez que mais de 50 bilhões de dólares está envolvido na produção e comercialização destes alimentos. A demanda é crescente e novas necessidades estão surgindo, como a de atender grupos específicos da população (YOON et al., 2006). A Tabela 1 mostra os principais compostos funcionais evidenciados pela ciência, suas funções e fontes alimentares.

Tabela 1: Ação e fontes alimentares dos compostos funcionais

Composto	Ação	Alimentos fonte
Isoflavonas	Ação estrogênica (reduz sintomas da menopausa) e anti-câncer	Soja e derivados
Proteínas de soja	Redução dos níveis de colesterol	Soja e derivados
Ácidos graxos ômega-3	Redução do LDL - colesterol; ação antiinflamatória; é indispensável para o desenvolvimento do cérebro e da retina de recém nascidos	Peixes marinhos como sardinha, salmão, atum, anchova, arenque, etc
Ácido α - linolênico	Estimula o sistema imunológico e tem ação antiinflamatória	Óleos de linhaça, colza, soja; nozes e amêndoas
Catequinas	Reduzem a incidência de certos tipos de câncer, reduzem o colesterol e estimulam o sistema imunológico	Chá verde, cerejas, amoras, framboesas, mirtilo, uva roxa, vinho tinto
Licopeno	Antioxidante, reduz níveis de colesterol e o risco de certos tipos de câncer, como de próstata	Tomate e derivados, goiaba vermelha, pimentão vermelho, melancia
Luteína e Zeaxantina	Antioxidantes; protegem contra degeneração macular	Folhas verdes (luteína). Pequi e milho (zeaxantina)
Indóis e Isotiocianatos	Indutores de enzimas protetoras contra o câncer, principalmente de mama	Couve flor, repolho, brócolis, couve de bruxelas, rabanete, mostarda

Flavonóides	Atividade anti-câncer, vasodilatadora, antiinflamatória e antioxidante	Soja, frutas cítricas, tomate, pimentão, alcachofra, cereja
Fibras solúveis e insolúveis	Reduz risco de câncer de cólon, melhora o funcionamento intestinal. As solúveis podem ajudar no controle da glicemia e no tratamento da obesidade, pois dão maior saciedade.	Cereais integrais como aveia, centeio, cevada, farelo de trigo, etc; leguminosas como soja, feijão, ervilha, etc.; hortaliças com talos e frutas com casca
Prebióticos - frutooligossacarídeos, inulina	Ativam a microflora intestinal, favorecendo o bom funcionamento do intestino	Extraídos de vegetais como raiz de chicória e batata yacon
Sulfetos alílicos (alilsulfetos)	Reduzem colesterol, pressão sanguínea, melhoram o sistema imunológico e reduzem risco de câncer gástrico	Alho e cebola
Lignanas	Inibição de tumores hormônio-dependentes	Linhaça, noz moscada
Tanino	Antioxidante, anti-séptico, vaso-constritor	Maçã, sorgo, manjeriço, manjerona, sálvia, uva, caju, soja
Estanóis e esteróis vegetais	Reduzem risco de doenças cardiovasculares	Extraídos de óleos vegetais como soja e de madeiras
Probióticos - Bifidobacterias e Lactobacilos	Favorecem as funções gastrointestinais, reduzindo o risco de constipação e câncer de cólon	Leites fermentados, Iogurtes e outros produtos lácteos fermentados

Fonte: adaptado de BVS, 2009

Os alimentos funcionais são heterogêneos, não podendo obedecer a um mesmo tipo de classificação. Essas diferenças afetam diretamente a aceitação e a intenção de consumo destes, uma vez que esbarra no hábito alimentar, além de outros aspectos relevantes, como fatores demográficos (gênero, idade e nível educacional) e estilo de vida (URALA; LAHTEENMAKI, 2007). Os probióticos são os únicos funcionais cujas fontes são industrializadas, uma vez que estes são primariamente veiculados na alimentação através do consumo de bebidas fermentadas, no geral de base láctea (PRADO et al., 2008).

4.3 Probióticos e prebióticos

Probiótico é uma palavra derivada do grego que significa “em favor da vida”. São considerados probióticos, de acordo com a Legislação Brasileira, micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2008; HARDY et al., 2013). A definição internacionalmente aceita para a definição de probióticos é que eles são “micro-organismos vivos não patogênicos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

Foi o pesquisador Elie Metchnikoff no ano de 1907 que fez o primeiro relato relacionando o consumo de um alimento suplementado com probiótico (*L. acidophilus*) e uma maior longevidade que, posteriormente, foi associada aos benefícios à saúde trazidos pelas bactérias lácticas. Em 1974 os probióticos foram definidos por Parker como micro-organismos que atuam na manutenção do balanço da microbiota intestinal (PARKER, 1974; FULLER, 1989).

Ao probiótico não basta apenas ser um micro-organismo vivo, ele deve ainda possuir as seguintes características: estabilidade ao ácido gástrico e aos sais biliares, capacidade de aderência à mucosa intestinal, capacidade de colonização do TGI humano, capacidade de produção de compostos antimicrobianos e desempenho de atividade metabólica no intestino humano (RAIZEL et al., 2011).

Os micro-organismos comumente descritos como probióticos são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, entretanto outros gêneros também fazem parte desta classificação (Tabela 2).

Tabela 2: Micro-organismos probióticos

Espécies <i>Lactobacillus</i>	Espécies <i>Bifidobacterium</i>	Outros
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bf. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Bf. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lb. casei sp. rhamnosus</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Bf. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis sp. cremoriss</i>
<i>Lb. delbrueckii sp. bulgaricus</i>	<i>Bf. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis sp. lactis</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Bf. longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides sp. dextranicum</i>
<i>Lb. gasseri</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb. johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. lactis</i>		<i>Streptococcus salivarius sp. thermophilus</i>
<i>Lb. paracasei</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		

Fonte: Extraído de Prado et al., 2008

Apesar de se apresentarem 35 espécies de micro-organismos com capacidade probiótica na Tabela 2, apenas possuem alegação de propriedade funcional aprovada pela ANVISA os que seguem: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei variedade rhamnosus*, *Lactobacillus casei variedade defens*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. É uma recomendação do mesmo órgão que o consumo desses probióticos esteja associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (ANVISA, 2008).

O uso dos probióticos na alimentação humana justifica-se pela gama de benefícios apontados ao longo dos anos. Evidências reportam o uso desses micro-organismos para melhoria da digestão da lactose, estimulação do sistema imune, modulação da microbiota intestinal, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Hoje ainda encontramos associações positivas do uso dos probióticos na diminuição do risco de câncer de cólon, na prevenção do risco cardiovascular e no tratamento e prevenção da obesidade, um atual problema de saúde pública (ZOPPI et al., 2001; CALDER; KEW, 2002; SAAD, 2006; VANDENPLAS; BENNINGA, 2009; SCARPELLINI et al., 2010; KRAMMER et al., 2011; LECERF, 2011).

O espectro das atividades dos probióticos incluem efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989). Três formas de ação dos probióticos são descritas: 1. Supressão de bactérias viáveis: acredita-se que os micro-organismos probióticos sejam capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana, o que suprimiria o número de micro-organismos patogênicos viáveis além de facilitar a competição por nutrientes e por sítios de adesão. 2. Alteração do metabolismo microbiano: esta ação se daria pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. 3. Estímulo da imunidade do hospedeiro: através do estímulo ao aumento dos anticorpos e da atividade dos macrófagos (ROBERFROID, 2002; SAAD, 2006; SAAD et al., 2011).

A parte b da Figura 1 detalha algumas hipóteses sobre os possíveis mecanismos de atuação dos probióticos no intestino humano.

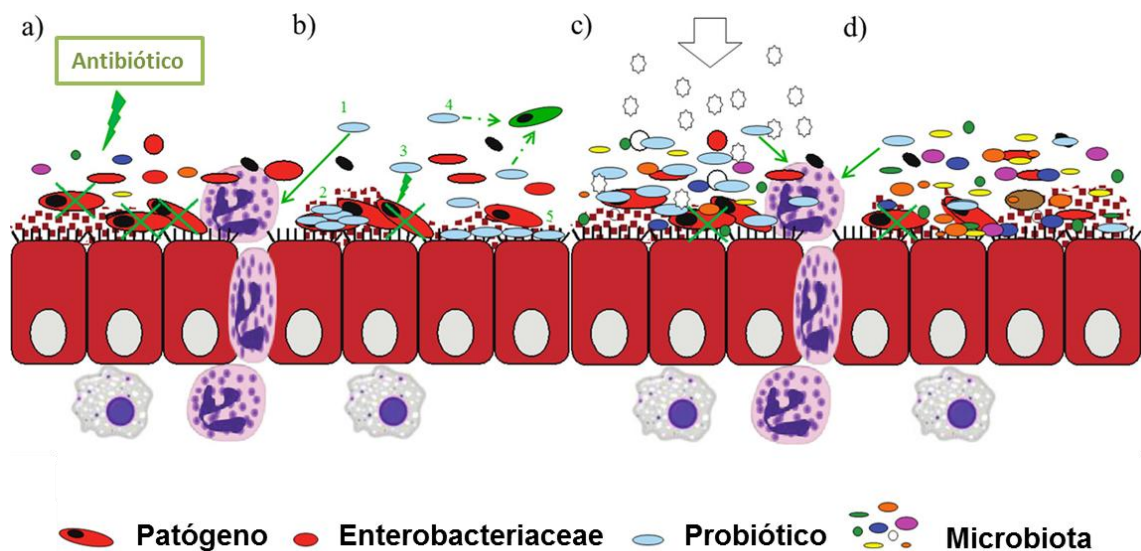


Figura 1: Mecanismos de interrupção da disbiose e restauro da homeostase intestinal saudável. a) Terapia com antibióticos; b) diferentes formas de ação dos probióticos; 1- efeito imunomodulador dos probióticos nas *tight junctions*; 2- Co-agregação com micro-organismos nocivos, inibindo o aparecimento de doenças; 3- Produção de bacteriocinas para eliminação de micro-organismos nocivos; 4- Sinalização celular para regulação negativa da produção de toxinas e expressão de virulência dos micro-organismos nocivos; 5- Exclusão dos sítios de ação por aderência; c) intervenção dietética com prebióticos (indicado pela seta); d) transplante fecal. *Fonte:* Walker; Lawleyb, 2013.

A suplementação da dieta com micro-organismos probióticos deu sequência a uma nova geração de produtos dos alimentos funcionais. Inicialmente os alimentos funcionais eram elaborados através da suplementação com vitaminas e minerais com reconhecidas funções fisiológicas. Em anos subsequentes os aditivos alimentares também passaram a ser considerados e então começaram a fazer parte da lista dos componentes que exerciam efeitos benéficos sob a flora intestinal. A adição não só de probióticos, mas também de prebióticos e de sua associação passou então a ser considerada e estimulada (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Prebióticos são conceituados como ingredientes não digeríveis no intestino humano, mas que servem de substrato para a fermentação de bactérias específicas na microbiota intestinal (LEE et al., 1999). A terminologia “prebiótico” foi introduzida pelos cientistas Gibson e Roberfroid em 1995 no artigo intitulado “*Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics*” publicado no reconhecido *The Journal of Nutrition* (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Desde então, vários estudos a fim de se identificar novas matérias primas prebióticas vêm sendo conduzidos (SABATER-MOLINA et al., 2009; CAMPOS et al., 2012).

Usualmente são usados três critérios para a determinação de um prebiótico: 1. Resistência à acidez gástrica, à hidrólise enzimática do TGI humano e à absorção gastrointestinal; 2. Possibilidade de fermentação pela microflora intestinal; 3. Estimulação seletiva do crescimento e atividade das bactérias intestinais que contribuem para a saúde e o bem estar (ROBERFROID, 2007).

Hoje apenas dois oligossacarídeos são de fato reconhecidos como prebióticos, a oligofructose e a inulina. Todos os outros encontram-se sob investigação (Tabela 3), sendo

alguns com respostas promissoras, caso dos galactooligossacarídeos e da lactulose (ROBERFROID, 2007).

Tabela 3: Condição prebiótica de diferentes oligossacarídeos.

Carboidrato	Não-digestibilidade	Fermentação	Seletividade	Condição prebiótica
Inulin and oligofructose	Yes	Yes	Yes	Yes
Galactooligosaccharides	Probable	???	Yes	Yes
Lactulose	Probable	???	Yes	Yes
Isomaltooligosaccharides	Partly	Yes	Promising	No
Lactosucrose	NA	NA	Promising	No
Xylooligosaccharides	NA	NA	Promising	No
Soybean oligosaccharides	NA	NA	NA	No
Glucooligosaccharides	NA	NA	NA	No

NA, dados não disponíveis; ???, dados preliminares, necessitando de mais estudos.

Fonte: Extraída de Roberfroid, 2007

Simbióticos são alimentos que possuem em sua formulação componentes prebióticos e probióticos simultaneamente. No intestino humano a interação entre as bactérias e hospedeiro caracteriza uma relação simbiótica, que pode ser otimizada mediante intervenção nutricional ou farmacológica com o uso de probióticos ou prebióticos (RAIZEL et al., 2011).

A associação destes dois ingredientes funciona como um fator multiplicativo, resultando numa ação sinérgica e mais eficiente que culmina numa melhor colonização do trato intestinal e, portanto no aumento dos benefícios esperados. A adaptação do micro-organismo probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo, garante a excelência da formulação (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001; BIELECKA et al., 2002).

4.4 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei é uma bactéria gram-positiva não esporulada que se apresenta como um grupo heterogêneo de bastonetes regulares (Figura 2). Pertencem ao grupo de bactérias lácticas, que tem em comum a capacidade de fermentar glicose a ácido lático.

Classifica-se como espécie facultativamente heterofermentativa, possuindo além da capacidade fermentativa da glicose, ainda a possibilidade de fermentação de hexoses em ácido-lático e pentoses em ácidos lático e acético (HOLZAPFEL et al., 2001; BURITI; SAAD, 2007).

As condições ideais de crescimento do *L. casei* dependem do pH, temperatura e meio de cultivo. Estudos demonstram que a bactéria apresenta crescimento mais significativo quando cultivada num meio rico em vitaminas, especialmente as do complexo B, apresentando pH ótimo de 6,5, podendo chegar a 7,0, além de apresentar melhor proliferação em temperaturas em torno de 37°C e sob anaerobiose (HOSSEIN et al., 2010).

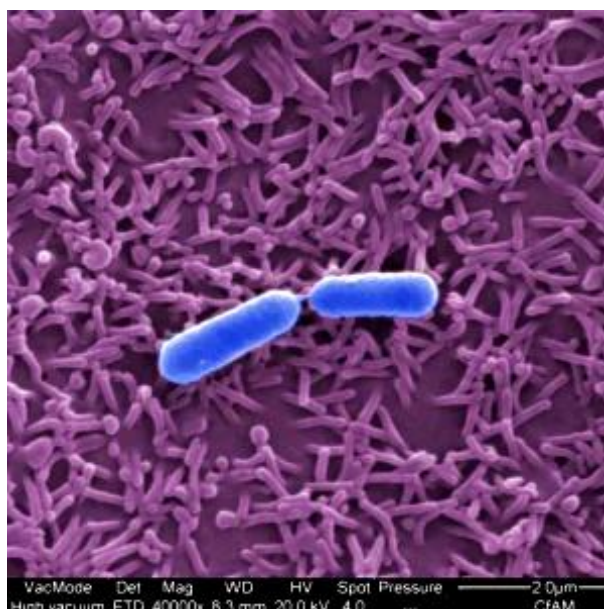


Figura 2: *Lactobacillus casei* ligado à uma célula intestinal humana.

Fonte: Centre for Advanced Microscopy (CFAM, 2012)

São vários os benefícios à saúde apontados pelo uso contínuo dos *L. casei* na alimentação. A aderência desses probióticos às microvilosidades intestinais e sua competição com micro-organismos patogênicos é o primeiro passo para a colonização que promove tais efeitos positivos no hospedeiro (FORESTIER et al., 2001; MIRNEJAD et al., 2013).

Estudos a cerca do *L. casei* têm demonstrado sua ação positiva na manutenção da microbiota intestinal, na prevenção de casos de diarreia, na diminuição da colonização por patógenos, na otimização do tratamento da giardíase e no tratamento da constipação funcional (GUANDALINI, 2011; SHUKLA et al., 2013; MAZLYN et al., 2013).

O uso desses probióticos também é capaz de atuar positivamente no controle dos lipídeos séricos, sendo relatado efeitos de diminuição dos níveis de triglicerídeo e colesterol (KUMAR et al., 2013) além do aumento da concentração cecal de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente acetato, propionato e butirato (DJOUZI et al., 1997).

O micro-organismo apresenta ainda efeito protetor da atividade imunológica do hospedeiro, possuindo atividade imunomodulatória e antialérgica (LEE et al., 2013). Estudos recentes demonstram ainda sua capacidade de suprimir a ação de agentes carcinogênicos (VERMA; SHUKLA, 2013).

Por tantos benefícios apresentados, a inserção deste micro-organismo na alimentação humana é uma das ocupações da biotecnologia, que tem se empenhado em desenvolver produtos de qualidade nutricional e sensorial que apresentem ainda o diferencial de conter probióticos em sua formulação. Os produtos lácteos são o principal veículo de administração de culturas probióticas (SHIBY; MISHRA, 2013).

4.5 Frutos tropicais

Frutos tropicais são aqueles que apresentam melhor desenvolvimento em regiões de clima tropical, ou seja, lugares situados entre os Trópicos de Câncer e de Capricórnio e que apresentam temperatura média superior a 20°C (25°C no verão), além de altos índices de chuva. No Brasil, o clima é encontrado no Nordeste, no Sudeste e no Centro-Oeste (Figura 3). A única característica comum dessas frutas é a intolerância à locais de clima frio (IBGE, 2014).



Figura 3: Variação de climas no Brasil Fonte: IBGE, 2014

4.5.1 *Abacaxi (Ananas comosus L. Merril)*

O abacaxi é uma das mais populares frutas tropicais devido ao seu sabor e aroma agradáveis (THÉ, 2007). A fruta é composta pela fusão quase completa de 100-200 bagas, podendo apresentar peso de 0,5 até 2,5Kg. É uma fruta rica em açúcares (14%) e em vitaminas, especialmente em provitamina A, C e as do complexo B. É comumente consumida fresca ou na forma de suco e sobremesas (TACO, 2011; FAO, 2013). Sua classificação botânica e características podem ser visualizadas no Quadro 1.

Nome científico: <i>Ananas comosus</i> L. Merril
Família: Bromeliaceae
Nomes populares: Abacaxi, ananás
Nome em inglês: Pineapple
Origem: Continente Americano (Brasil e Paraguai)

Quadro 1: Classificação botânica e características do abacaxi. Fonte: EMBRAPA (2013a)

É uma das frutas com maior cultivo no Brasil com destaque para as cultivares Pérola, mais produzida no Nordeste Brasileiro, especialmente na Paraíba e na Bahia (ROGERIO et al, 2007) e a Smooth Cayenne, cultivada em menor escala na Região Sudeste (EMBRAPA 2009). Dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) indicam que o país ocupa o segundo lugar na produção mundial de abacaxi (FAO, 2013).

4.5.2 *Manga (Mangifera indica L.)*

A manga é uma fruta carnuda e de sabor e aroma marcantes. Apresenta variação em sua forma, tamanho e cor, mas no geral tem formato ovóide-oblongo, medindo até 30 cm x 10 cm e apresenta coloração que varia do verde-amarelado ao avermelhado. A fruta é uma boa fonte de vitamina A e é comumente consumida fresca ou na forma de suco (TACO, 2011; FAO, 2013). Sua classificação botânica e características podem ser visualizadas no Quadro 2.

A manga é uma das frutas tropicais mais consumidas no mundo. Dados da FAO (2013) indicam que o Brasil ocupa o sétimo lugar na produção mundial do fruto, com uma produção crescente. Dados do IBGE (2011) indicam que a produção brasileira de manga no ano de 2011 foi em torno de 5% maior que a registrada em 2010. As cultivares Haden, Tommy e Keitt são as de maior importância para o Brasil, com destaque para a Tommy que apresenta maior resistência e produtividade, sendo direcionada para exportação. Os maiores importadores de manga do Brasil são a Holanda e os Estados Unidos (FRANCO et al., 2004).

Nome científico: *Mangifera indica* L.

Família: Anarcadiaceae

Nome popular: Manga

Nome em inglês: Mango

Origem: Sul da Ásia

Quadro 2: Classificação botânica e características da manga. Fonte: EMBRAPA (2013b)

4.5.3 Maracujá (*Passiflora edulis* Sims)

O maracujá é reconhecido popularmente por apresentar propriedades calmantes. O fruto maduro é consumido principalmente na forma de suco, entretanto é um fruto comumente usado para confecção de compotas e geleias. A fruta é bastante apreciada devido ao seu sabor e aroma agradáveis, além de ser uma boa fonte de provitamina A e vitamina C (EMBRAPA, 1994; 2013c; FAO, 2013). Sua classificação botânica e características podem ser visualizadas no Quadro 3.

Nome científico: <i>Passiflora edulis</i> Sims
Família: Passifloraceae
Nomes populares: Maracujá, maracujá-mirim, maracujá-suspiro, maracujá-peroba, maracujá-pequeno, flor-da-paixão
Nome em inglês: Passion fruit
Origem: Provavelmente Brasil

Quadro 3: Classificação botânica e características do maracujá. Fonte: EMBRAPA (2013c)

Os principais países produtores de maracujá encontram-se na América do Sul, com destaque para Brasil, Colômbia, Peru e Equador (SOUZA et al., 2002; PIRES; MATA, 2004). Dados do IBGE (2012) indicam que a produção brasileira de maracujá em 2012 chegou a pouco mais de 776 mil toneladas de frutos em uma área plantada de 57.848 hectares, com rendimento médio de 13,42 t/ha. Os maiores Estados produtores são: Bahia, Ceará, Minas Gerais, Sergipe, Espírito Santo e São Paulo. Os maiores importadores de maracujá do Brasil são a Holanda e Alemanha (SECEX, 2014).

4.6 Bebidas probióticas de origem vegetal

A maioria dos produtos probióticos é de origem láctea (PRADO et al., 2008), entretanto, estudos recentes vêm trazendo uma nova perspectiva de aplicação que inclui dentre outros, o uso de bebidas à base de frutas e vegetais (SOCCOL et al., 2007; CÉSPEDES et al., 2013).

O uso de alimentos de origem vegetal justifica-se, dentre tantos benefícios, pela possibilidade de atender a distintos grupos populacionais como os vegetarianos e indivíduos intolerantes ou alérgicos a componentes lácteos, como também a possibilidade de oferta de uma bebida isenta de colesterol e rica em vitaminas e minerais, inerentes do próprio fruto (SOCCOL et al., 2010). O uso de suco de frutas também não apresenta o inconveniente de possuir compostos alérgenos, caso de alguns produtos lácteos (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004).

Outras razões que apontam para o desenvolvimento de bioprodutos de origem vegetal são os reconhecidos benefícios do consumo regular de frutas e verduras e ainda por questões econômicas e sazonais, otimizando o consumo regular ao longo do ano, ao passo que se aproveita toda matéria prima que poderia ser perdida se não houvesse processamento (SCHMIDT; PEREIRA, 2011).

Alguns autores relatam a realização de experimentos para elaboração de bebida probiótica à base vegetal, como com suco de abacaxi (SHEEHAN et al., 2007), de laranja (LUCKOW et al., 2004), de beterraba, tomate e cenoura (PRADO et al., 2008). Os autores relatam que esta nova classe de produtos seria o futuro dos alimentos probióticos, apesar dos maiores desafios tecnológicos encontrados.

Sucos e néctares podem ser adicionados de ingredientes prebióticos e probióticos, sendo possibilitada ainda a formulação de uma terceira classe de produtos: o simbiótico. Achados recentes demonstram que a fermentação induzida pelos micro-organismos probióticos tende a modificar em demasia as características sensoriais do suco (*off-flavor*), o que sugere o reconhecimento da formulação de um novo produto à base vegetal e não a manutenção das terminologias “suco, ou néctar” (LUCKOW et al., 2006; SCHMIDT; PEREIRA, 2011).

Um dos maiores problemas encontrados diz respeito ao impacto sensorial dos produtos. Mudanças na aparência, textura, sabor e aroma são relatadas, interferindo diretamente na aceitação dos produtos (VLIEG; HUGENHOLTZ, 2007). A modificação sensorial em produtos vegetais é muito mais pronunciada que nos de base láctea (SORENSEN; BOGUE, 2005).

O grande desafio na formulação de bebidas vegetais probióticas encontra-se, portanto, na dificuldade de agregar funcionalidade ao passo que se mantém o sabor culturalmente reconhecido como agradável dos sucos de fruta e de outros vegetais. Estratégias para driblar tais dificuldades seriam segundo Luckow et al. (2006):

- Mascarar o sabor indesejável com o uso de sucos de sabor marcante.
- Estimular o consumo frequente da bebida pelo consumidor, o que possivelmente acarretaria numa adaptação ao novo sabor.
- Inculcar no consumidor a mudança do sabor à agregação funcional, que culmina em benefícios à saúde.

Metodologia

5. METODOLOGIA

5.1 Elaboração da farinha de inhame (FI)

A FI foi obtida através de experimentação com base nas metodologias descritas por Ventura e Fontoura (1994) e Leonel et al. (2006), com modificações detalhadas na Figura 4. A análise dos procedimentos de obtenção da farinha por estes autores originou a proposta de quatro fluxogramas que foram testados e avaliados para que se obtivesse uma matéria prima de qualidade sob o aspecto higiênico, sensorial e nutricional.

O Inhame (*Dioscorea cayennensis*) foi selecionado em mercados locais da região metropolitana do Recife, sendo escolhidos tubérculos com características e tamanho semelhantes. Após seleção, os tubérculos foram pesados, medidos e então submetidos à lavagem com abrasão em água corrente com o intuito de retirar as sujidades. Seguiram pelo processo de sanitização em solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos e então descascados.

A partir desta etapa as matérias primas seguiram por diferentes procedimentos que podem ser visualizados na Figura 4 e estão descritos a seguir:

Experimento 1

O inhame foi triturado em liquidificador da marca ARNO® e em seguida disposto em bandejas de alumínio e então submetido à estufa para secagem a uma temperatura de 70°C até secagem total (mantida para os demais experimentos)

Experimento 2

O inhame foi fatiado (4-6mm), submetido à secagem em estufa (Figura 5) e posteriormente à trituração em multiprocessador da marca ARNO®

Experimento 3

Após fatiamento do inhame (espessura de 4-6mm), o mesmo foi submetido a um processo de resfriamento em água potável numa temperatura entre 10-12°C e seguiu pelos processos de secagem e trituração.

Experimento 4

Após fatiamento (1-2mm) e resfriamento (10-12°C), as fatias foram branqueadas em água potável à 90-95°C por 3 minutos e seguiram pelos processos de secagem, trituração e pulverização em moinho (Fritsch pulverisette 14) a uma velocidade de 17.000-19.000 rpm.

Todas as farinhas obtidas foram submetidas à peneiração em peneiras arredondadas com abertura das malhas a 80 mesh (0,177mm) acopladas a um vibrador (Podutest), por 15 minutos. As farinhas foram acondicionadas em potes estéreis de vidro transparente com tampa rosqueada (Figura 6).

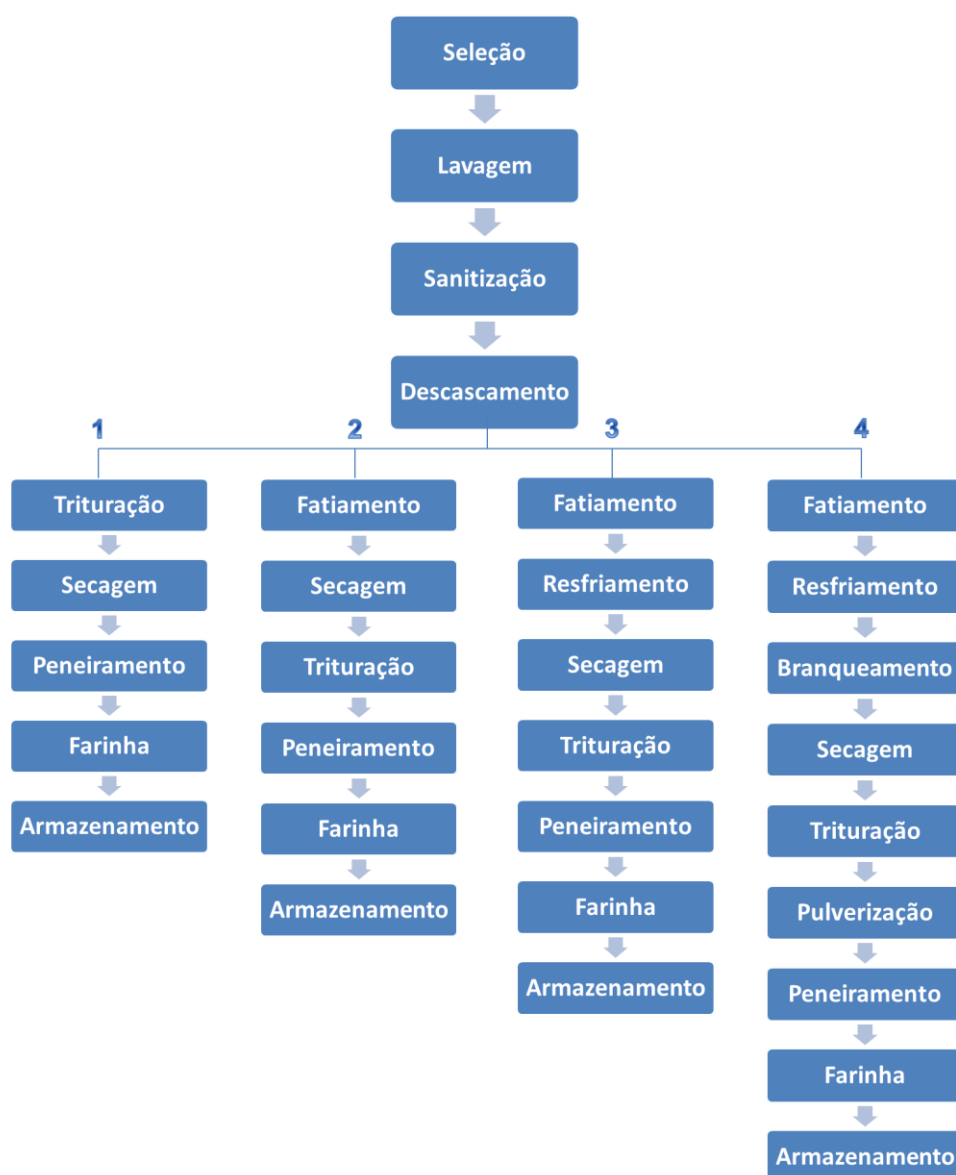


Figura 4: Fluxogramas testados para obtenção da farinha de inhame (*Dioscorea cayennensis*). 1, 2, 3 e 4 indicam o experimento.



Figura 5: Fatias de inhame antes e após secagem em estufa à 50-70°C por 4 horas



Figura 6: Farinha de inhame (*Dioscorea cayennensis*).

5.2 Caracterização da farinha de inhame

5.2.1 Análises físico-químicas e valor energético total

As análises físico-químicas realizadas estão expressas na Tabela 4. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores médios obtidos expressos em g/100g. Os valores de pH, acidez e atividade de água foram expressos numericamente. O valor energético total (VET) foi calculado através do somatório das calorias oferecidas pelos macronutrientes, a saber, 4 Kcal/g para carboidratos (CHO) e proteínas (PTN) e 9 Kcal/g para lipídios (LIP). Para tanto foi usada a seguinte equação:

$$1- \text{ VET} = (\text{CHO} \times 4) + (\text{PTN} \times 4) + (\text{LIP} \times 9)$$

Tabela 4: Análises físico-químicas

Análise	Princípio	Referência
Umidade (U)	Perda por dessecação através de secagem direta em estufa a 105°C	IAL, 2008
Cinzas (CZ)	Resíduos por incineração em Mufla à 550°C	IAL, 2008
Lipídios/ extrato etéreo (LIP)	Extração direta em Soxhlet	IAL, 2008
Proteínas/ protídeos (PTN)	Determinação de nitrogênio pelo método clássico de digestão Kjeldahl e conversão para proteína através do fator 6,25	IAL, 2008
Carboidratos/ glicídios (CHO)	Calculado por diferença através da seguinte formula: $\text{CHO} = 100 - (\text{U} + \text{CZ} + \text{LIP} + \text{PTN})$	-
Fibra alimentar total (FAT) – 985.29	Método enzimático gravimétrico	AOAC, 2002
Amido	Determinação de glicídios redutores por titulação após hidrólise ácida	IAL, 2008
Açúcares totais	Redução e determinação em glicose	IAL, 2008
Açúcares redutores	Redução e determinação em glicose	IAL, 2008
pH	Medição eletrométrica em potenciômetro	-
Acidez	Titulação com Solução de fenolftaleína	IAL, 2008
Atividade de água (aW)	Medição direta em analisador de atividade de água (LabTouch-aw – Novasina)	-

IAL: Instituto Adolf Lutz; AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

5.2.2 Análises microbiológicas

Adequando-se à legislação vigente para padrões microbiológicos de alimentos (BRASIL, 2001) foram realizadas as análises microbiológicas descritas na Tabela 5, de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

Tabela 5: Análises microbiológicas

Análise	Referência AOAC, 2002	Técnica	Expressão dos resultados
Coliformes a 45°C	966.24	Tubos múltiplos	NMP/g
<i>Estafilococos</i> coagulase positiva	965.55	Enumeração, isolamento e confirmação.	UFC/g
<i>Bacillus cereus</i>	980.31	Enumeração, isolamento e confirmação	UFC/g
<i>Salmonella</i> sp/25g	967.26	Enriquecimento seletivo, isolamento e identificação bioquímica	Presença/ ausência

5.2.3 Estabilidade da farinha ao armazenamento

A farinha de inhame, armazenada em potes estéreis de vidro com tampas rosqueadas, foi mantida em ausência de luz e em sala em temperatura entre 28 e 37°C por 180 dias. Nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, a fim de avaliar a sua qualidade total, as amostras foram coletadas de forma aleatória e então submetidas à avaliação microbiológica e química, que consistiu da pesquisa de coliformes a 45°C/g, bolores e leveduras, *estafilococos* coagulase positiva/g, *salmonella* sp/25g, *bacillus cereus*/g, descritos na Tabela 5 e umidade e atividade de água (Aw), descritos na Tabela 4. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.4 Determinação de frutanos totais

Os frutanos totais (oligofrutanos, derivados da inulina e frutooligossacarídeos) foram determinados pelo método enzimático-espectrofotométrico (AOAC 999.03) descrito por McCleary et al. (2000). A amostra foi extraída com água quente e tratada com uma mistura de sacarase, alfa-amilase, pululanase e maltase para liberação de glicose e frutose. Após neutralização os frutanos foram hidrolisados com uma mistura de exo e endo-inulinases e a leitura dos açúcares redutores em solução foi realizada em espectrofotômetro ajustado para 410 nm. A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso em percentual.

5.2.5 Caracterização cromática

A análise da cor foi realizada em colorímetro Minolta Chroma Mater CR-400 por meio do sistema de leitura de três parâmetros (L^* , a^* , b^*), com base na escala CIELab. O parâmetro L^* está associado à luminosidade das amostras, a coordenada cromática a^* está associada à dimensão verde-vermelho e a coordenada cromática b^* está associada à dimensão azul-amarelo. A análise cromática da amostra foi realizada nos tempos 0 e 180 dias de armazenamento da farinha, a fim de verificar possíveis alterações de coloração.

A diferença total da cor (ΔE) entre os valores determinados no tempo final e inicial de armazenamento da farinha foi determinada através da seguinte fórmula:

$$2- \Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

5.2.6 Análise Granulométrica por Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS (Dynamic Light Scattering)

A análise de distribuição do tamanho das partículas foi determinada através de um aparelho com difração a laser (Microtrac, modelo - S3500) com um ultra-som para aumentar a dispersibilidade da amostra. O diâmetro médio foi determinado com base no diâmetro médio de uma esfera de mesmo volume (diâmetro de Brouckere). 38 mg da FI foram dispersos em isopropanol e submetidos à leitura de distribuição do tamanho de partículas. A análise foi realizada em triplicata.

5.2.7 Difração de Raio-X

A difração de raio-x da FI foi obtida utilizando um difratômetro Bruker, modelo D8 – Advanced. A farinha foi espalhada em um suporte de amostragem até formação de uma fina camada homogênea. A região de trabalho foi definida com base na busca dos picos padrões do amido.

5.2.8 Espectroscopia de infravermelho

A farinha foi analisada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em um equipamento Bruker (modelo vertex 70), com detector *deuterated triglycine sulfate* (DTGS) e amostragem por atenuação total de refletância (ATR). A região espectral foi do infravermelho médio 500 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Foi obtido um total de 64 aquisições espectrais.

5.2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens foram obtidas a partir um microscópio eletrônico de varredura Quanta – FEI, modelo FEG 200 utilizando um detector de elétrons secundários (SEI) em regime de alto vácuo. As amostras foram fixadas em plataformas metálicas ou “stubs” através de uma fita adesiva de carbono e em seguida foi recoberta com ouro metálico para aumentar a condutividade superficial e facilitar a aquisição das imagens de SEI.

5.3 Obtenção das polpas dos frutos

Os frutos tropicais usados para este estudo foram o Abacaxi (*Ananas comusus L.*), a Manga (*Mangifera indica, L.*) e o Maracujá (*Passiflora ssp*). Para obtenção das polpas, os frutos foram selecionados de acordo com padrões de identidade e qualidade (MAPA, 2003), pesados em balança eletrônica da marca Filizola[®], lavados em água corrente e submetidos à sanitização em água clorada a 200 ppm por 15 minutos. Em seguida os frutos foram enxaguados em água potável e seguiram por diferentes procedimentos após esta etapa:

Manga e abacaxi

As polpas de manga e abacaxi foram obtidas a partir do descascamento seguido de corte e trituração em liquidificador semi-industrial da marca ARNO® (Figura 7)

Maracujá

A polpa de maracujá foi obtida a partir do corte do fruto para exposição da polpa, seguido de despulpamento e breve homogeneização em liquidificador semi-industrial da marca ARNO®. O sumo obtido foi peneirado manualmente em peneira de 20 mesh para eliminação de partes não comestíveis (Figura 7).

As polpas foram imediatamente direcionadas para a obtenção dos sucos tropicais.

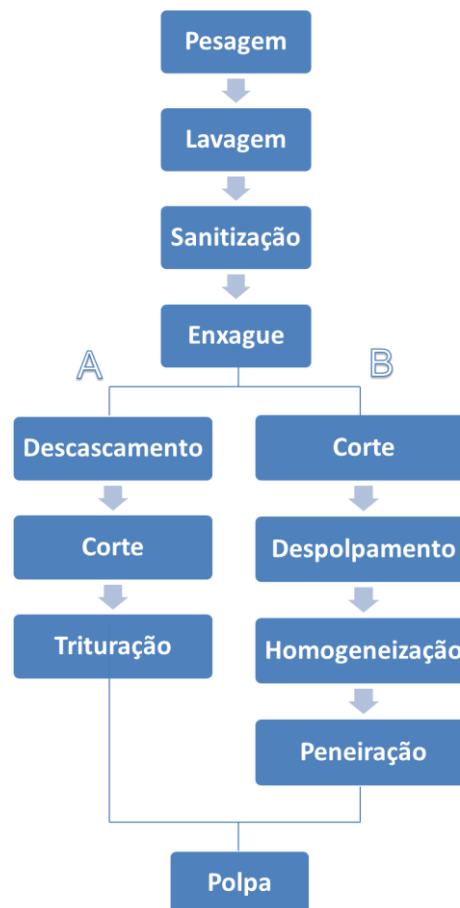


Figura 7: Fluxograma para obtenção das polpas dos frutos tropicais. A: Abacaxi (*Ananas comusus L.*) e Manga (*Mangifera indica, L.*). B: Maracujá (*Passiflora ssp.*).

5.4 Obtenção dos sucos tropicais

Para obtenção dos sucos tropicais as polpas foram medidas e diluídas de acordo com o que está estabelecido na Tabela 6. As concentrações das polpas de cada sabor obedeceram aos critérios determinados pela Legislação Brasileira para sucos tropicais e foram estabelecidas após realização de estudo piloto para verificar aspectos sensoriais de aparência, textura, além de adequação ao limite dos sólidos solúveis preconizado pela legislação (MAPA, 2003). Para realização deste estudo foi estabelecida a não utilização de açúcar de adição.

Tabela 4: Concentração de polpa de fruta usada para a obtenção dos sucos tropicais.

Sabor da polpa	Percentual usado para obtenção do suco tropical*
Abacaxi	55%
Manga	35%
Maracujá	31%

* De acordo com a legislação, que permite a diluição para adequação do Brix.

Os sucos tropicais foram submetidos ao processo de pasteurização (72°C por 5 minutos) e seguiram imediatamente para um banho de gelo ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). Após resfriamento até 35°C, os sucos foram direcionados para a elaboração das bebidas funcionais. O fluxograma para obtenção dos sucos tropicais pasteurizados pode ser visualizado na Figura 8.



Figura 8: Fluxograma para obtenção dos sucos tropicais pasteurizados.

5.5 Desenvolvimento das bebidas

As bebidas foram desenvolvidas a partir do acréscimo de três diferentes concentrações da FI aos diferentes sucos tropicais. Para cada sabor de suco dois controles foram estabelecidos, um neutro (C), que consistia apenas no suco tropical e o controle positivo (C+), que consistia no suco adicionado da cepa probiótica de *L. casei*. As demais bebidas também foram elaboradas a partir do suco tropical com adição da FI nas concentrações de 2,0%, 3,5% e 5,0%. Desta forma procedeu-se a elaboração de quinze diferentes bebidas experimentais (Figura 9).

As concentrações de FI usadas para o preparo das bebidas foram estabelecidas em estudo piloto e tiveram como meta principal a palatabilidade do suco em face do acréscimo da farinha. A concentração máxima estabelecida foi aquela em que a textura farinácea ainda não se mostrava perceptível.

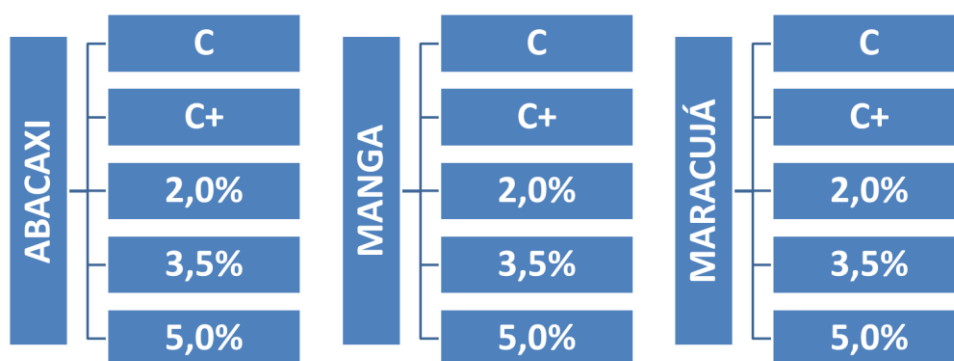


Figura 9: Painel de elaboração de bebidas com diferentes concentrações da farinha de inhame (C= Controle; C+ = controle positivo; 2,0%, 3,5% e 5,0% indicam a concentração de farinha de inhame na bebida).

5.5.1 Ativação e viabilização da cepa

L. casei foi adquirido na forma liofilizada (Infarmed) e inoculado em meio seletivo para lactobacilos (MRS - MAN, ROGOSA e SHARPE) e submetido à estufa em temperatura de 37°C por 72 horas sob anaerobiose para então ser ativado. Para verificação da viabilidade da cepa foi realizado o procedimento de diluição em tubos múltiplos até 10^{-7} . Foi inoculado, também sob anaerobiose, 1ml do substrato na diluição máxima pela técnica de profundidade e em meio MRS Agar e então submetido à estufa em temperatura de 37°C. A contagem das

UFCs em placas procedeu-se após 48 horas. Após verificação da viabilidade, a cepa foi mantida em estufa à temperatura à 37°C até utilização (BALDUINO et al., 1999).

5.5.2 Adição dos probióticos às bebidas

A cultura iniciadora de *L. casei* foi adicionada às bebidas, imediatamente após sua elaboração, na concentração de 2% de inóculo, com auxílio de pipetador automático.

5.5.3 Fermentação

A fim de se realizar técnicas de reprodutibilidade garantida e de baixo custo de manutenção, a fermentação foi realizada à temperatura ambiente. Após adição dos probióticos às bebidas, as mesmas foram mantidas numa sala em temperatura de 27 ± 2 °C por 48 horas. Após a fermentação, as bebidas foram acondicionadas sob refrigeração a 10 ± 2 °C.

O fluxograma seguido para a elaboração das bebidas funcionais pode ser visualizado na Figura 10.

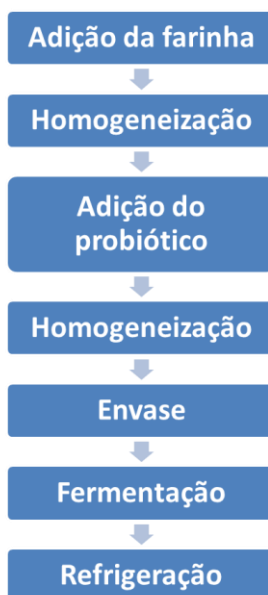


Figura 10: Fluxograma de obtenção das bebidas funcionais.

5.6 Análises microbiológicas das bebidas

As análises microbiológicas seguiram as recomendações do Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001). Foram realizadas as análises de Coliformes à 45°C e de *Salmonella sp.* nas bebidas. A metodologia usada foi a descrita pela AOAC (2002), conforme Tabela 5.

5.7 Validação do processo fermentativo

Para verificação da fermentação ácida, característica da cepa em estudo, foi verificado o pH das bebidas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas. A viabilidade dos probióticos nas bebidas foi verificada após a fermentação (Tempo 48 horas), através dos procedimentos já descritos no item 5.5.1.

5.8 Análise sensorial das bebidas

5.8.1 Aspectos éticos

Para realização dos testes a seguir o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e obteve aprovação através do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número: 15312113.2.0000.5208 (Anexo 2). Todos os provadores voluntários foram esclarecidos e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

5.8.2 Teste de aceitabilidade

As amostras de bebidas com diferentes concentrações da farinha do inhame, dos três diferentes sabores, foram apresentadas de forma aleatorizada e codificadas com números de 3 dígitos em cabine sensorial a provadores não treinados. Para avaliação foi utilizada uma escala hedônica de 9 pontos cujos limites apresentavam a seguinte classificação: 1 para “Desgostei muitíssimo” e 9 para “Gostei muitíssimo” (Apêndice 2) (MEILGARD, 1987).

5.8.3 Teste de intenção de compra

A atitude dos consumidores quanto à intenção de compra foi avaliada através de uma escala de 5 pontos cujos limites apresentavam a seguinte classificação: 1 para “Certamente não compraria” e 5 para “Certamente compraria” (Apêndice 2) (ABNT, 1998).

5.8.4 Teste de ordenação de preferência

As bebidas elaboradas também foram submetidas a um teste discriminativo de ordenação de preferência a fim de verificar a preparação mais aceita para cada sabor. Durante o teste as amostras com diferentes concentrações da FI, dos três diferentes sabores, foram apresentadas de forma aleatorizada e codificadas com números de 3 dígitos em cabine sensorial a provadores não treinados. As amostras foram ordenadas de forma decrescente de preferência pelos julgadores (Apêndice 2) (IAL, 2008).

5.9 Determinação da composição centesimal dos bioprodutos

As bebidas usadas nas análises sensoriais descritas tiveram sua composição centesimal estabelecida. Foram realizadas análises de umidade, proteína, lipídio, cinzas e fibras. Os carboidratos totais foram determinados por diferença. O detalhamento das análises realizadas pode ser visualizado na Tabela 4. O valor energético total (VET) foi calculado como já descrito no item 5.2.1.

5.10 Análise da sobrevivência do *L. Casei* a fluidos simulados do trato gastrointestinal

A sobrevivência do probiótico das bebidas selecionadas após análise sensorial foi avaliada através de simulações das fases da digestão (gástrica e entérica), de acordo com as metodologias descritas por Liserre et al., 2007 e Santos et al., 2011, com modificações. As análises foram realizadas no primeiro (tempo 0) e último dia (tempo 28 dias) de análise da estabilidade ao longo da vida em prateleira.

5.10.1 Resistência ao ácido e à pepsina (Simulação da fase gástrica)

As bebidas foram diluídas na proporção de 1:9 em solução fisiológica (solução salina à 0,85%) e adicionadas em solução ácida de pepsina (3g/L; pH 2,5). As amostras foram incubadas à uma temperatura de 37°C (temperatura corporal) por 120 minutos sob agitação de cerca de 150 rpm. Os testes foram realizados em quadruplicata frente ao controle (em triplicata) que consistiu na incubação da bebida na mesma diluição sem a presença do ácido ou da enzima.

Para verificação da resistência da cepa ao processo digestivo simulado, sua viabilidade foi testada através da incubação da amostra em meio MRS a uma temperatura de 37°C por 72 horas sob anaerobiose. Os resultados estão expressos em log UFC.mL⁻¹.

5.10.2 Resistência aos sais biliares (Simulação da fase entérica)

As bebidas foram diluídas na proporção de 1:9 em solução fisiológica (solução salina à 0,85%) e adicionadas em solução básica de bile bovina (3g/L; pH 7,5). As amostras foram incubadas à uma temperatura de 37°C (temperatura corporal) por 120 minutos sob agitação de cerca de 150 rpm. Os testes foram realizados em quadruplicata frente ao controle (em triplicata) que consistiu na incubação da bebida na mesma diluição sem a presença da bile. Para verificação da resistência da cepa ao processo digestivo simulado sua viabilidade foi testada através da incubação da amostra em meio MRS a uma temperatura de 37°C por 72 horas sob anaerobiose. Os resultados estão expressos em log UFC.mL⁻¹.

5.11 Avaliação da vida em prateleira das bebidas funcionais

As bebidas selecionadas após análise sensorial foram submetidas à avaliação do número de bactérias viáveis, pH e estabilidade biológica, conforme item 5.6, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após sua fermentação. Para análise de bactérias viáveis as amostras foram tratadas como descrito no item 5.5.1. As colônias foram contadas e os resultados expressos em log UFC.mL⁻¹. A análise de pH foi realizada em potenciômetro.

5.12 Processamento e análise dos dados

Os dados obtidos foram avaliados com o programa Excel *for Windows* por análise de variância (ANOVA), seguido de teste t para comparação de médias. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

6. RESULTADOS

Os resultados oriundos desta tese estão apresentados em dois blocos. O primeiro bloco refere-se à caracterização da FI elaborada. Os dados apresentados encontram-se sob proteção intelectual e serão direcionados para reconhecimento de patente, desta forma apenas a descrição dos resultados obtidos encontra-se nesta tese. Apenas após o término do tramite de reconhecimento de patente os resultados serão direcionados para a elaboração de mais um artigo.

O segundo bloco de resultados está apresentado na forma de artigos originais, como exigido pelo Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Os dados deram origem aos três artigos originais que seguem:

Artigo original 1:

Functional beverage of Passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) fermented with *Lactobacillus casei*.

Artigo original 2:

Development and characterization of functional beverage of Pineapple (*Ananas comosus L. Merril*) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) fermented with *Lactobacillus casei*

Artigo original 3:

Functional Mango (*Mangifera indica L.*) and Yam (*Dioscorea cayennensis*) beverage fermented with *Lactobacillus casei*.

6.1 Caracterização da Farinha de Inhame

Durante a fase de experimentação para obtenção das farinhas do inhame, observou-se que o preço do quilo do tubérculo variou de R\$ 4,95 a R\$ 6,20 demonstrando que no período de safra do inhame no Nordeste, que ocorre no segundo semestre do ano, há uma maior oferta no mercado, ocasionando uma notável redução do preço do produto.

No momento da seleção da matéria prima procurou-se uniformizar a escolha com base nos tamanhos e formatos, tendo os tubérculos em média comprimento de 31,3 cm, circunferência de 28,88 cm e peso de 2,17 Kg (Figura 11). Foi verificado, através da relação entre o peso bruto e o peso líquido, o fator de correção de 1,42 e o rendimento médio de 20,2% para a farinha obtida no quarto experimento.



Figura 11: Tubérculo de Inhame (*Dioscorea caynensis* Lam.)

As metodologias empregadas para obtenção das farinhas se mostraram práticas e de fácil execução. No primeiro experimento observou-se um tempo extremamente elevado para o processo de secagem. A farinha obtida apresentou massa úmida, textura pouco uniforme, coloração escura, além de apresentar *off flavor*, caracterizado por odor não usual daquele esperado para o produto.

Nos segundo e terceiro experimentos, com a substituição da trituração pelo fatiamento do inhame, as farinhas obtidas apresentaram textura satisfatória que se assemelhavam à farinha de mandioca, entretanto a coloração escura, apesar de menos intensa, permaneceu em ambos experimentos, ainda que no terceiro experimento tenha sido realizado o resfriamento das fatias. Também se observou uma diminuição significativa no tempo de secagem das

fatias, sugerindo uma relação inversa entre a espessura da fatia e o tempo de secagem, baseando-se no conceito de aumento da superfície de contato.

No quarto experimento, com acréscimo dos processos de branqueamento e pulverização, foi obtida uma farinha de excelente qualidade, de coloração clara, odor agradável e textura fina assemelhando-se à farinha de trigo (Figura 6). O tempo para obtenção das fatias secas também foi reduzido, como esperado, devido à diminuição de sua espessura, que foi padronizada em chips de 2mm (Tabela 7).

Tabela 7: Relação entre a temperatura e o tempo de secagem com a espessura da fatia do inhame (*Dioscorea cayennensis*).

Experimento	Temperatura da estufa (°C)	Tempo de secagem (horas)	Espessura da fatia (mm)
01	70	22	triturada
02	70	7	4 - 5
03	70	6	4 - 5
04	70	4	1 - 2

O regulamento técnico que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, não estabelece limites para bolores e leveduras em hortaliças, raízes e tubérculos secos ou desidratados. Desta forma todas as análises foram avaliadas comparativamente ao que está estabelecido para farinha de mandioca, por também tratar-se de um tubérculo.

Todas as amostras atenderam aos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação para farinha de mandioca. As análises apresentaram valores médios menores que 10 UFC (Unidades Formadoras de Colônia), demonstrando assim uma boa condição higiênica para a fabricação do produto, classificando-o como seguro. A análise comparativa dos resultados apresentados na Tabela 8 evidencia uma redução na carga de crescimento dos micro-organismos, que possivelmente se deve à diminuição do tempo total de obtenção da farinha.

Tabela 8: Resultados das análises microbiológicas para os diferentes experimentos utilizados para obtenção da Farinha de Inhame

Análises	Experimento			
Microbiológicas	1	2	3	4
Coliformes a 45°C/ NMP/g	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Estafilococos coagulase positiva/g	< 10	< 10	< 10	< 10
Bacillus cereus/g	2 x 10	< 10	< 10	< 10
Salmonella sp/25g	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Bolores e Leveduras UFC/g	7,4 x10 ²	3,1 x10 ²	< 10	< 10

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônia por grama.

NMP/g: Número Mais Provável por grama.

Após análise criteriosa dos resultados descritos anteriormente, a farinha obtida no quarto experimento foi selecionada para as análises que seguem.

6.1.1 Análises físico-químicas e valor energético total

A comparação das análises do inhame in natura e da farinha obtida evidencia uma excelente redução da umidade do tubérculo, concentrando os valores dos nutrientes presentes em 100 gramas da matéria prima (Tabela 9).

A farinha de Inhame apresentou ótima composição nutricional. Observa-se que ela é rica em carboidratos, apresentando um alto teor de amido e fibras. Também é evidente um alto valor energético, sendo pobre em lipídios.

Tabela 9: Composição centesimal, pH e acidez do inhame *in natura* e convertido em farinha

Análises	Inhame <i>in natura</i>	Farinha de inhame
	g.100 g⁻¹	g.100 g⁻¹
Umidade	81,47	3,31
Cinzas	0,42	4,60
Proteína	0,77	8,57
Lipídio	0,17	0,61
Carboidrato	17,18	81,68
Fibra Alimentar Total	2,24	10,7
Amido	15,58	74,5
Açúcares - totais e reductores	-	Tr*
Valor Energético Total (Kcal)	73,33	366,53
pH	6,29	5,85
Acidez	0,73	2,24

* Traços

6.1.2 Análises microbiológicas e estabilidade da farinha ao armazenamento

O propósito da verificação da vida de prateleira da farinha foi de subsidiar o seu emprego de forma segura sob o aspecto microbiológico.

A análise dos resultados obtidos até 180 dias de experimento evidenciou que a farinha de inhame atendeu todos os critérios dispostos pela RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA, indicando um controle eficaz da contaminação durante todas as etapas do processamento da farinha, além de fornecer garantia quanto a qualidade higiênico sanitária do produto (Tabela 10).

Tabela 10: Perfil microbiológico da farinha de inhame sob armazenamento por 180 dias

Análises Microbiológicas	Resultados							Valores de referência (RDC 12 de 2 de janeiro de 2001)
	Dias							
	0	30	60	90	120	150	180	
Coliformes a 45°C/ NMP/g	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	10 ²
Bolores e Leveduras UFC/g	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	*
Estafilococos coagulase positiva/g	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	*
Salmonella sp/25g	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Bacillus cereus/g	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	3 x 10 ³

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônia por grama.

NMP/g: Número Mais Provável por grama.

* Não é exigido pela legislação

A estabilidade física da FI durante o armazenamento pode ser visualizada na Tabela 11, que indica os valores médios de umidade e atividade de água apresentada pela farinha durante 180 dias de armazenamento.

Tabela 11: Umidade e atividade de água da farinha do inhame sob armazenamento por 180 dias

Análises	Dias						
	0	30	60	90	120	150	180
Umidade	3,31	3,41	5,49	5,58	5,71	5,88	5,94
Atividade de água (Aw)	0,304	0,359	0,364	0,371	0,388	0,392	0,407

6.1.3 Determinação de frutanos totais

A análise de frutanos totais foi realizada através método enzimático-espectrofotométrico (AOAC 999.03).

O percentual de frutanos apresentado na amostra foi de 0,25%, indicando que o inhame não é uma boa fonte dessas fibras prebióticas.

6.1.4 Caracterização cromática

A cor foi determinada no sistema CIEL*a*b* através dos parâmetros: L* (luminosidade), a* e b* (coordenadas de cromaticidade). Neste sistema, L* indica a luminosidade (0 = preto e 100 = branco) e a* e b* indicam as direções que a cor pode assumir (+a* = vermelho e -a* = verde; +b* = amarelo e -b* = azul).

Uma farinha é considerada branca quando ela possui valor de L* superior a 93, de a* próximo à zero (inferior a 0,5 ou negativo) e de b* inferior a oito.

A análise da Tabela 12 evidencia que uma mudança de cor foi observada durante os 180 dias de armazenamento, com diminuição no parâmetro L*, indicando que a farinha ficou mais escura, mais verde e mais azul. Muito possivelmente ocorreu oxidação natural dos pigmentos conhecidos como carotenos, que se encontram entre o espectro vermelho e amarelo. A diferença de cor (ΔE^*) observada foi de 21,8.

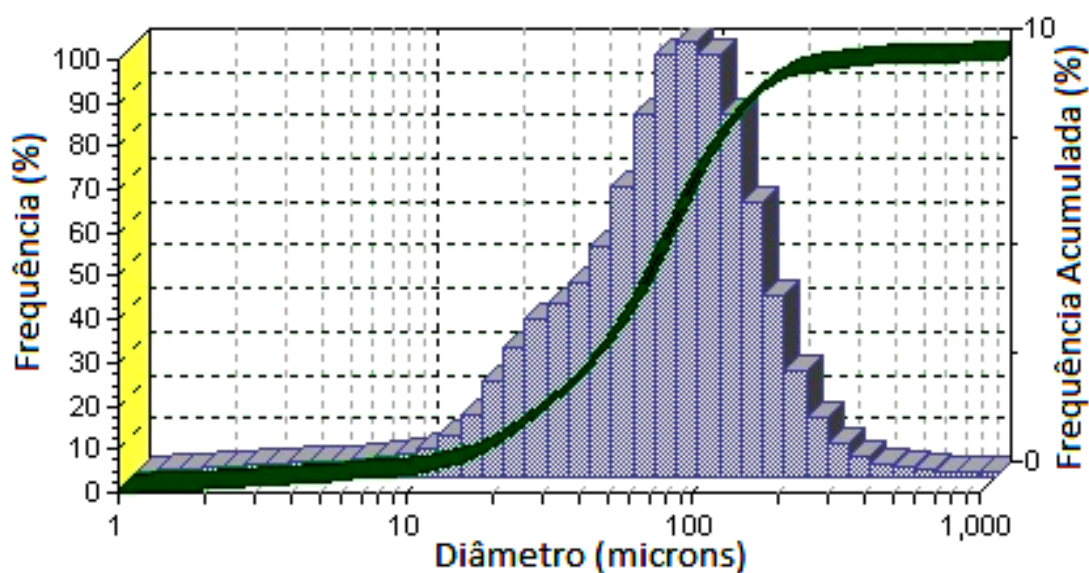
Tabela 12: Caracterização cromática da farinha de inhame sob armazenamento por 180 dias

Coordenada cromática	Tempo (dias)	
	0	180
L*	98,43	76,72
a*	0,5	0,02
b*	9,07	7,28

L* – Luminosidade. a* - coordenada cromática associada à dimensão verde-vermelho. b* - coordenada cromática associada à dimensão azul-amarelo.

6.1.5 Análise Granulométrica por Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS (Dynamic Light Scattering)

As análises do diâmetro das partículas de farinha de inhame demonstraram uma distribuição do tipo monomodal não homogênea (Figura 12). A distribuição média em volume determinada foi de 83,23 ($\pm 0,47$) μm .

**Figura 12:** Diâmetro das partículas da Farinha de Inhame (*Dioscorea cayennensis*)

Quanto às distribuições em percentual, os resultados mostram que 10% das partículas têm diâmetros menores que 19,00 ($\pm 0,02$) μm , 50% menores que 67,88 ($\pm 0,48$) μm e 90% menores que 150,8 ($\pm 0,43$) μm .

6.1.6 Difração de Raio-X

A Figura 13 ilustra a difração de raio-X da amostra de farinha de inhame (em preto) e o padrão de difração de amido (em vermelho). O resultado evidencia claramente que a FI contém amido em sua composição, principalmente quando comparados com os picos padrões do amido, corroborando com os dados já apresentados na Tabela 9.

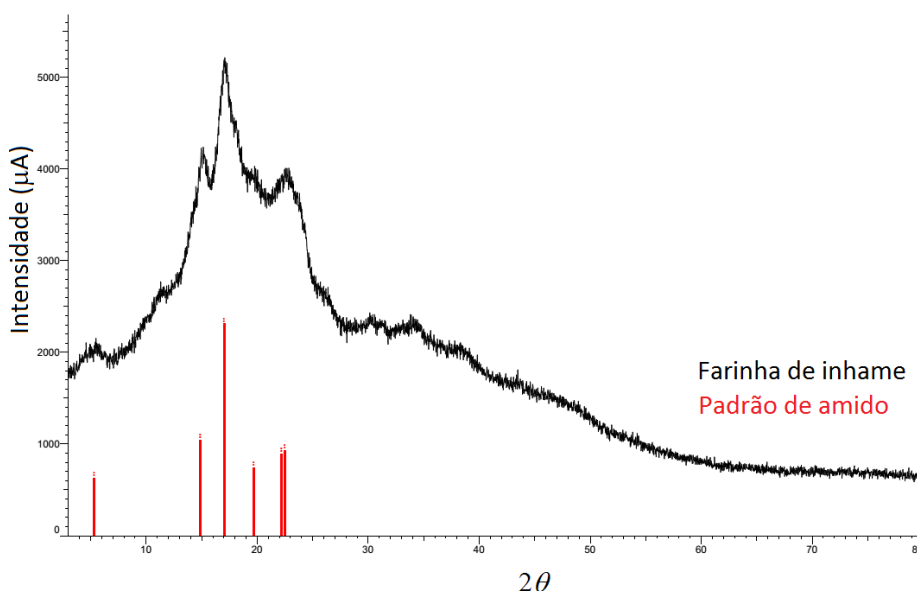


Figura 13: Difração de raio-x da Farinha de Inhame (*Dioscorea caynnensis* Lam.)

6.1.7 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia foi usada para investigar a composição da farinha de inhame. O resultado da análise pode ser visualizado na Figura 14. A região espectral onde se localiza o modo vibracional máximo de 3287 cm^{-1} é característico de ligações $-\text{OH}$ livres. Os modos 2934 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} e 997 cm^{-1} são peculiares de ligações de grupos metilas (ligações C-H), ligações de carbonila $\text{C}=\text{O}$ e por fim, C-O atribuída à alcoóis. Todas essas ligações são também específicas do amido.

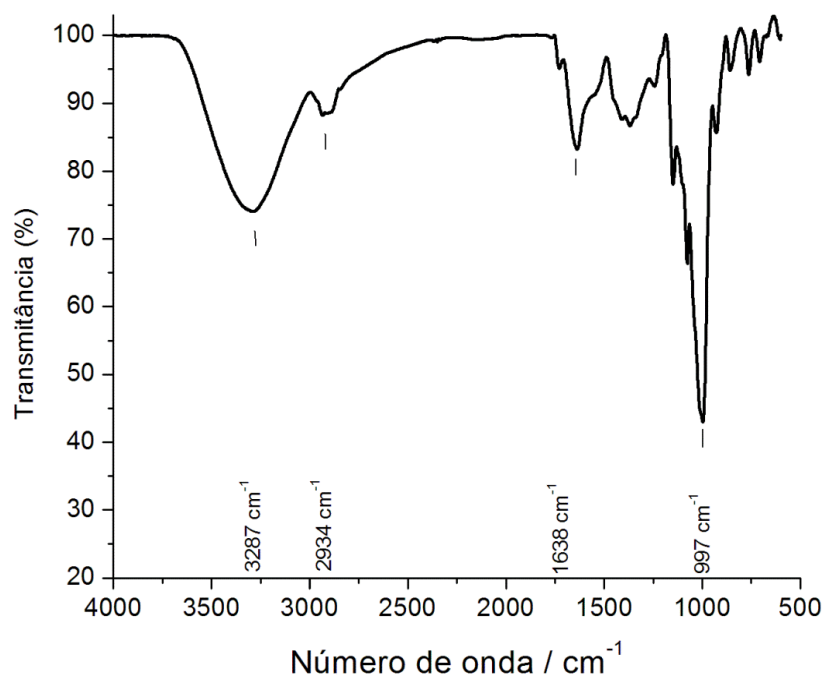


Figura 14: Espectroscopia de infravermelho da Farinha de Inhame (*Dioscorea cayennensis*)

6.1.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 15 são apresentadas imagens da exploração da FI através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As imagens confirmam os diâmetros médios já observados na Análise Granulométrica por Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS e mostram a imagem microscópica de grânulo de amido (A) da farinha de inhame, que apresenta formato esférico.

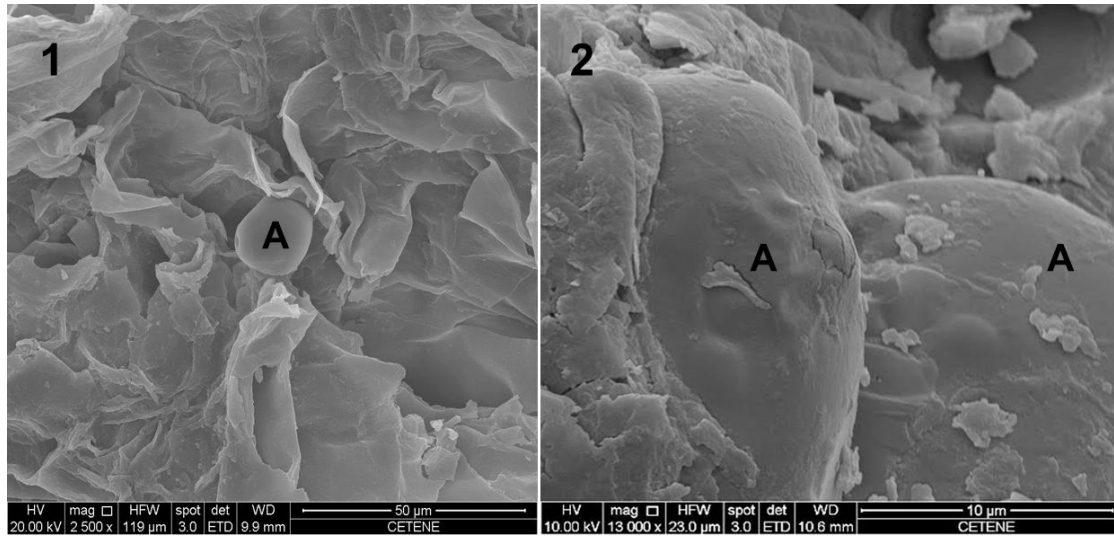


Figura 15: Imagens de exploração da Farinha de Inhame (*Dioscorea cayennensis*) através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV). 1- imagem microscópica de grânulo de amido (A) da farinha de inhame, mostrando sua forma esférica. 2-Ampliação do grânulo de amido (A), mostrando detalhes de sua superfície.

6.2 Artigo original 1

Artigo submetido à revista **Food Research International** (Anexo 3)

Título: Functional beverage of Passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) fermented with *Lactobacillus casei*.

Fator de impacto: 3.005

Qualis (nutrição): A2

Title:

Functional beverage of Passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) fermented with *Lactobacillus casei*

Authors:

Cinthia Karla Rodrigues do **Monte-Guedes***^a

Joyce Ramos da **Silva**^b

Thayza Christina Montenegro **Stamford**^c

Tânia Lúcia Montenegro **Stamford**^b

*Corresponding author (see address below)

a - College of Nutrition – Federal University of Alagoas

b - Department of Nutrition – Federal University of Pernambuco

c - Department of Tropical Medicine – Federal University of Pernambuco

Address: Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária - CEP:57072-900 - Maceió-AL, Brazil.

Telephone number: +55-82-32141145

e-mail: ckrvasconcelos@gmail.com or ckrodrigues@hotmail.com

Highlights

- The consumption of fermented dairy products is limited by some population groups.
- Passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) and yam (*Dioscorea caynnensis*) beverage was fermented by *Lactobacillus casei*.
- Passion fruit and yam have nutrients which promote the growth of probiotic cultures.
- The product shelf life was 28 days under refrigeration (10 ± 2 °C).
- The passion fruit was efficient in masking the *off flavor* of fermented beverages.
- *L. casei* was adapted to the beverage and resistance to simulated gastrointestinal tract in vitro during shelf life.

Abstract

The purpose of this study was to produce a non-dairy functional beverage containing *L. casei* using passion fruit (PF) and yam flour (YF). The consumer acceptance, the feasibility in shelf life and the resistance of *L. casei* to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion were tested. The beverages were considered good sources of fiber and they were well accepted to aroma, color and appearance parameters. It shows effectiveness of PF in masking odors of fermentation. The counts of *L. casei* were $> 10^6 \text{.mL}^{-1}$ during shelf life (28 days) and the microorganism showed resistance to *in vitro* gastrointestinal tract simulations. PF and YF together showed to be excellent raw materials to be tested in non-dairy probiotic products development.

Keywords: *Lactobacillus casei*; Passion Fruit (*Passiflora edulis Sims*); Yam (*Dioscorea Caynnensis*); *In vitro* simulated gastrointestinal digestion.

Abbreviations

0-D – The day of the preparation of the beverages

2.0, 3.5 and 5.0% - Concentration of yam flour

28-D – The 28th day of storage

C - Control beverage (juice only)

C+ - Positive control beverage (juice added *L. casei*)

FF - Functional food

L - Lipid

P – Protein

PB - Probiotics

PF - Passion Fruit

TC - Total carbohydrate

TE - Total Energy

YF - Yam Flour

1. Introduction

Functional food (FF) consumer has increased because of its recognized benefits. Health and wellness are the high lights of food industry (Martins et al., 2013). The increasing search for FF, in particular probiotics (PB), justified by the range of benefits provided to consumers, among which we mention the prevention of dysbiosis (Zoppi et al., 2001), the decrease of cases of constipation and diarrhea (Vandenplas & Benninga, 2009; Krammer et al., 2011.), the immunological benefits (Calder & Kew, 2002) and more recently suggested in the prevention of obesity, a current public health problem (Scarpellini et al., 2010; Lecerf, 2011). PB are beneficial microorganisms that, when administered in appropriate amounts, contribute to the balance of the intestinal tract and thus to human health (Fuller, 1989; FAO/WHO, 2001). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera are the most common PB microorganisms used in FF industry (Champagne et al., 2011).

There are several health benefits identified by the continuous use of *Lactobacillus casei* feeding. The adhesion of these PB to intestinal microvilli and its competition with pathogens is the first step for colonization that promotes such positive effects on the host (Forestier et al., 2001; Mirnejad et al., 2013). Furthermore their use has been reported in manufacturing non-dairy products (Sheehan et al., 2007; Martins et al., 2013).

Most PB products is of milk origin (Prado et al., 2008), however recent studies have brought a new perspective of application which includes among others, the use of beverages from fruit and vegetables (Soccol et al., 2007, Céspedes et al., 2013).

The use of plant foods is justified, among many benefits, the opportunity to attend different population groups such as vegetarians and intolerant or allergic to milk components individuals. The possibility to offering a drink free from cholesterol and rich in vitamins and minerals, inherent in the fruit itself, is very promising (Soccol et al., 2010). The use of fruit

juice also presents the drawback of not possessing allergen compounds case of some dairy products (Luckow & Delahunty, 2004).

The development of off-flavor due to fermentation is more evident in the vegetable-based beverage than in produced with milk and derivatives (Lucknow & Delahunty, 2004). The choice of a vegetable technologically able to mask this effect is a major challenge. According Luckow et al. (2006) one of the most efficient ways to mask the off-flavor is the use of tropical fruit juices with pronounced flavor, like passion fruit – PF (*Passiflora edulis Sims*). PF are mostly native from Latin America. Brazil is the leading producer and consumer of the fruit. Its aroma and acidity is very pronounced. The pH ranges from 2.8 to 3.3. It's widely accepted and commonly used in juices, jams and yogurt manufacturing (Oliveira et al., 2013; FAO, 2013; EMBRAPA, 2014).

Yam (*Dioscorea caynensis*) is a very popular tuber in Brazil and African countries. It has been studied by it's interesting functional properties such as act as an immunomodulator (Jheng et al., 2012), modulates intestinal absorption of lipids (Nishimura et al., 2011), antiobesity agent (Xiao et al., 2010), besides have antioxidant and anti-inflammatory effects (Han et al., 2013; Chiu et al., 2013).

The yam flour (YF) is the most common form of processing and can be obtained from raw or yam mash. It can be added to other foods to provide better nutritional intake as well as add functional properties (Laudan, 1997; Mestres et al., 2004).

The purpose of the present study was to produce a non-dairy functional beverage containing a recognized PB using PF and YF. We analyzed consumer acceptance of the beverage, taking into account the off flavor and in addition we checked the feasibility of the beverage for 28 days storage and the resistance of *L. casei* to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion.

2. Material and methods

2.1 Obtaining the tropical PF juice

The fruits were selected, weighed on an electronic scale, and washed in running water and sanitized in chlorinated water (200 ppm - 5 minutes). They were then rinsed in clean water and then cutted, pulp and brief homogenised in semi-industrial blender. The pulp obtained was manually sifted for removal of inedible parts. To obtain the tropical juice pulp was diluted at a ratio of 31% for adequacy Brix (6.00), according to criteria established by Brazilian legislation for Tropical Juices (BRASIL, 2003). No added sugar was used in the beverages.

2.2 Obtaining the YF (*Dioscorea cayennensis*)

The yam was washed and scorched in running water and and sanitized in chlorinated water (150 ppm - 15 minutes). After peeling and slicing, have undergone bleaching, drying, crushing and pulverizing (unpublished results). The chemistry of the flour is shown in Table 1. The microbiological safety was tested negative for coliforms at 45 °C, coagulase positive *staphylococci*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp/25g and molds and yeasts (AOAC, 2002).

TABLE 01 ABOUT HERE

2.3 Activation and viability of *L. casei*

L. casei subsp. *paracasei*. lyophilisate was inoculated in a selective medium for lactobacilli (MRS - Man, Rogosa and Sharpe) at 37 °C for 72 hours under anaerobic conditions. The viability of the strains was tested by the multiple tube dilution procedure to 10^{-7} and 1 mL of substrate was inoculated onto MRS agar for depth at 37 °C for 72 hours. The CFU count was performed on the plates.

2.4 Development of functional beverages by PF

Beverages were developed from addition of three different concentrations of YF (2.0%, 3.5% and 5.0%) into PF juice previously pasteurized (72°C – 5 min). The inoculum of *L. casei* was added to beverages at a concentration of 2%. The beverages were then kept at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ for 48 hours for fermentation and then placed in the refrigerator at $10 \pm 2^\circ\text{C}$. During fermentation, the pH range was monitored. Two controls, juice only (C) and positive control (C+ - juice added *L. casei*), were established.

2.5 Chemical composition and microbiological analyzes of beverages

Chemical composition of the beverages was established. Analyzes of moisture, protein (P), lipid (L), ash, total carbohydrate (TC) and fiber were performed. All analyzes were performed in triplicate and average values expressed in g/100g. The total energy (TE) was calculated by the following equation: $\text{TE} = (\text{TC} \times 4) + (\text{P} \times 4) + (\text{L} \times 9)$.

Analyzes for the absence of coliforms at 45°C and *Salmonella* in 25 and 50 mL of the beverage were performed in triplicate (AOAC, 2002).

2.6 Sensory analysis of beverages

Sixty-two untrained tasters participated in the acceptance and preference tests. The sensory analyses were performed after approval by an Ethics Research Committee (protocol 15312113.2.0000.5208/2013). The samples were stored for 24 h at $10 \pm 2^\circ\text{C}$ prior to the evaluation. 50 mL of the beverages, coded with three-digit random numbers placed on small white cups and served immediately after being taken out of the refrigerated storage. The acceptance of appearance, color, taste, aroma, appearance and overall liking were evaluated on a 9-point hedonic scale, ranging from 1 (dislike very much) to 9 (like very much). Descending ordering beverages was requested, according to preference of the tasters.

The attitude of consumers regarding the purchase intention was assessed using a 5-point scale ranging from 1 (certainly not buy) to 5 (certainly buy).

The following analyses occurred at selected beverage in sensorial analysis who contained 2.0% of YF.

2.7 Evaluation of shelf life

The shelf life consisted by viable bacteria count, pH, and biological stability (see item 2.5) at 0, 7, 14, 21 and 28 days of fermentation. For analysis of viable bacteria samples were treated as described in item 2.3. The colonies were counted and the results expressed as log CFU.mL⁻¹. The pH analysis was performed at potentiometer.

2.8 *L. casei* survival to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion

In vitro gastrointestinal digestion was performed by union and modification of methods of Liserre et al., 2007 and Santos et al., 2011. Tests were performed in quadruplicate. The control consisted of incubation of sample without pH change or enzyme addition. For verification of the resistance to simulated digestive process viability was tested by incubating the sample, after exposure, in MRS medium at 37 ° C for 72 hours under anaerobic conditions. The results are expressed as LogUFC.mL⁻¹. Analyzes occurred on the preparation of the beverages (0-D) and 28 days after (28-D). Sample was first diluted in saline 0.85% (1:9) and to measure the resistance to acid and pepsin (gastric phase) it's added to acidic solution of pepsin (3g/L; pH 2.5). The mixture was incubated in a shaking (150 rpm) at 37 °C for 120 minutes. To measure resistance to bile (enteric phase) it's add to basic solution of bovine bile (3g/L; pH 7.5). The mixture was incubated in a shaking (150 rpm) at 37 °C for 120 and 240 minutes.

2.9 Statistical Analysis

All assays were made in triplicate and the results were expressed as average of the assays. The results of bacterial count and sensory attributes were submitted to analysis of variance (ANOVA), considering YF concentration. Paired sample t-tests, at the 95% confidence interval ($p < 0.05$), were used for comparing hedonic means obtained for overall liking, appearance, aroma, taste and color in the session. Values are presented in the text as means or means $\pm$ standard deviations.

3. Results and Discussion

3.1 Beverages fermentation process

The fermentation of beverages was monitored over 72 hours. Figure 1 shows that there was variation in pH thru time. No significant differences were observed between 24 and 72 hours (*time axis) for all samples, indicating that the minimum pH values were achieved in time 48h, suggesting maximum lactic acid production by *Lactobacillus*. Study on optimization of fermentation done by Pereira et al. (2011) in tomato juice also found best status of *L. casei* time 48h at 30 ° C.

Statistical analysis also indicated no difference in the evolution of pH between samples and C + 2% (*ph axis), suggesting that the addition of YF in a concentration of 2% does not significantly interfere in the metabolic behavior of *L. casei* when compared to control without YF. All other averages differ significantly. The pH of the beverages suffered proportional increase in the quantity of added YF when compared 2% and 5% beverages (#) ($p = 0.01$), showing that the addition of the YF was effective to decrease the acidity of the medium. Studies show that PB decrease viability during storage in several conditions like acid environments (Sheehan et al., 2007; Champagne & Gardner, 2008). The reduction in acidity caused by YF could therefore support a better resistance and adaptation of microorganism.

FIGURE 1 ABOUT HERE

3.2 Chemical composition and microbiological analyzes of beverages

The chemical composition analysis of the beverages shows that they are rich in carbohydrates and fiber, with low calorific value. The compositions can be seen in Table 2.

TABLE 2 ABOUT HERE

For a food to be considered a good source of fiber it must provide at least 10% of the recommended dietary fiber (Brownawell et al., 2012). Based on the recommendation of the Dietary Reference Intakes (IOM, 2005) which is 25g fiber / day for young adults, a food source must provide at least 3g of fiber in the portion. Thus all beverages in this study can be considered good sources of fiber as they provide 3.78 g (15.1%), 4.10 g (16.4%) and 4.42 g (17.7%) in portions of 200mL of beverages with 2.0%, 3.5% and 5.0% of YF respectively. The microbiological safety of the beverages was also tested, with negative results for all analyzes, indicating excellence in hygiene and sanitary measures taken to carry out the experiments.

3.3 Sensory analysis of beverages

62 untrained panelists participated in the sensory tests. The mean age was 22.4 ± 4.19 years, and the majority (82.6%) was female. Sensory tests included analysis of acceptability, purchase intent and ranking of preference.

The sensory attributes evaluated were color, taste, aroma, appearance and overall liking. The ANOVA indicated no variation between beverages, however the paired analysis showed significant differences in the perception of the attributes with a significant difference in all pairs tested. The acceptance rate of beverages for each attribute being evaluated and can be seen in Table 3. The color, appearance, and aroma overcame the taste and overall quality in scores. Color and appearance varied between " liked much" and " liked extremely " and aroma ranged from " enjoyed regular " and " liked much " Studies such as Luckow & Dellahunt (2004) and Ellendersen et al. (2012) showed that the preference was closely related to the assessment of taste and aroma (flavor) that food presents. This can be aimed with a

differential of this study that found satisfactory scores (73.89 ± 0.4) for the attribute aroma. These data demonstrate the effectiveness of PF in masking odors of fermentation, being efficient to maintain pleasant and usual odor of the fruit.

The fermentation of PF with a probiotic microorganism is unprecedented in the literature and points to good prospects of acceptance. Other vegetable beverages like mixed fruit drink, cashew and apple have been considered as a good alternative for the development of FF containing PB (Champagne & Gardner, 2008; Pereira et al, 2011; Ellendersen et al. 2012). Evidences reported the feasibility of using vegetable products for the consumption of PB (Martins et al., 2013).

Scores to taste and overall quality varied between "indifferent" and "dislike lightly", which certainly was due not only to the unknown and cultural flavor of Brazil, especially in the age group studied, but also by the absence of added sugar, common habit in the country according data from Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (Levy et al., 2012).

TABLE 3 ABOUT HERE

Figure 2 shows the deformation of the pentagonal radar on taste and overall liking sides, reaffirming the statistical findings. These results are similar to those described in the literature, indicating that the taste displayed by vegetable-based beverages is always deprecated the detriment of the original flavor of the vegetable (Luckow & Delahut, 2004; Ellendersen et al., 2012). One of the strategies that help change this scenario is to associate to the product functional qualities, like health claim (Luckow et al., 2006).

FIGURE 2 ABOUT HERE

The mean of the scores assigned to the intention of buying the beverages were 2.53 ± 1.26 , 2.21 ± 1.09 and 2.11 ± 1.06 , respectively for beverages with a concentration of 2%, 3.5% and 5.0% of YF. Scores revolved around scale 2 (probably not buy), indicating that most of the tasters was not inclined to buy the beverages, showing that food consumption is strongly related to the tast that the food presents. This association is already well reported in the literature (Ventura & Mennella, 2011; Galindo et al., 2012; Martínez-Ruiz et al., 2014). On the issue of preference a total of 46.7% of people stated prefer the beverage containing 2% of YF. Other concentrations obtained 26.65% of votes each. The choice for the beverage with less flour content may be due texture since there was no significant difference in any of others sensory parameters.

3.4 Evaluation of shelf life

The beverage had a more pronounced acceptability was added 2% YF, and is thus selected to evaluate stability over 28 days of storage.

Figure 3 shows the variation in pH of the beverage during storage. Within 7 days there was a progressive increase in the acidification of the medium and from this point there was a slight increase in the pH that remained nearly constant up to 28 days. Despite the observations no statistical difference was evidenced by the t test.

The count of lactic acid bacteria was carried out on days 0, 7, 14, 21 and 28 days storage and showed 7.67, 6.50, 7.07, 6.32 and 6.41 LogUFC.mL⁻¹, respectively. Figure 3 shows the values represented in graphical form, where there is a growth diauxic curve of *L.casei*. Can also observe that the count of CFU did not differ statistically in the days 7, 21 and 28 (*), showing a positive effect of diauxic behavior in the shelf life of the beverage, which until 28 days of storage had the same value of viable lactobacilli that found on the seventh day of storage.

The analysis of results emphasizes that *L. casei* exerted probiotic role since also presented excellent adaptation to acid during the whole storage period (Sheehan et al., 2007) also presented the CFU count $> 10^6$.mL⁻¹, minimum required to exert positive effects on the body (Kurmann & Rasic, 1991; Fooks & Gibson, 2002).

FIGURE 3 ABOUT HERE

3.5 Resistance to simulated gastrointestinal tract in vitro by *Lactobacillus*

The mean counts of *L. casei* obtained at times 0 and 28 days are shown in Figure 4. The average values were 7.48, 6.57, 6.18 and 5.00 LogUFC.mL⁻¹ for Control, Pepsin, Bile 2h and Bile 4h treatments on the preparation of beverages (D-0), respectively, and 6.15, 4.68, 4.90 and 4.20 LogUFC.mL⁻¹ for Control, Pepsin, Bile 2h and Bile 4h treatments on the 28th day of storage (D-28), respectively.

Statistical analysis showed that all treatments in both periods differed significantly from control (#), the same applies for Bile 2h and 4h (*) treatments. The count on D-28 was lower than in the D-0 for all treatments (o) ($p < 0.05$).

Most of fermented products exhibiting low cell viability after oral administration because bacteria do not survive to acid environment of stomach (Klayraung et al., 2009). The bile released in the small intestine is also harsh to PB survive it because their rich lipids cell membrane is destroyed (Gilliland & Speck, 1987).

Despite the decrease in viable cells of *L. casei* it showed to be adapted to the beverage and extreme conditions which was subjected during simulations

The lactic bacteria are difficult microorganisms because of this demand for various essential amino acids and vitamins for growing. They are also the principal microorganisms responsible for the natural fermentation of vegetables (De Valdez et al., 1990; Rivera-

Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010). These conditions may affect positively the microorganism's adaptation.

FIGURE 4 ABOUT HERE

4. Conclusions

Consume of vegetal beverages with probiotic is an alternative to substitute dairy products in diet. PF and yam together showed to be excellent raw materials to be tested and use for this finality, showing promising results. This study showed that color, aroma and appearance were well accepted for consumers. An excellent shelf life was demonstrated as well as *L. casei* showed to be adapted to acid beverage and resisted to in vitro gastrointestinal tract simulations. Although the results further testing should be encouraged to improve beverages acceptance.

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (2002). Official methods of analysis, 13^a ed. Washington.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003). Instrução normativa N° 12, de 4 de setembro de 2003. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical.
- Brownawell, A.M., Caers, W., Gibson, G.R., Kendall, C.W.C., Lewis, K.D., Ringel, Y., & Slavin, J.L. (2012). Prebiotics and the Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research, and Goals. *The Journal of Nutrition*. doi: 10.3945/jn.112.158147.
- Calder, P.C., & Kew, S. (2002) The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 28, 1, S165-S176.
- Céspedes, M., Cárdenas, P., Staffolani, M., Ciappini, M.C., & Vinderola, G. (2013). Performance in nondairy drinks of probiotic *L. casei* strains usually employed in dairy products. *Journal of Food Science*. 78(5), 56-62.
- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*. 41, 539–543.
- Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*. 149(3), 185-93.
- Chiu, C.S., Deng, J.S., Chang, H.Y., Chen, Y.C., Lee, M.M., Hou, W.C., Lee, C.Y., Huang, S.S., & Huang, G.J. (2013) Antioxidant and anti-inflammatory properties of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb. var. *pseudojaponica* (Hayata) Yamam.) and its reference compounds. *Food Chemistry*. 15, 141(2), 1087-96. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.031.

- De Valdez, G.F., De Giori, G.S., Garro, M., Mozzi, F., & Oliver G., (1990). Lactic acid bacteria from naturally fermented vegetables. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 8, 175–179.
- Ellendersen, L. S. N., Granato, D., Guergoletto, K. B., & Wosiacki, G. (2012). Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. *Engineering in Life Sciences*. 12(4), 475–485.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. (2014) Perguntas e Respostas: Maracujá. http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-maracuja.php. Accessed 02 Jan 2014.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization - FAO/WHO (2001). Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Accessed 02 Fev 2014.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO. (2013). Faostat. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Accessed 07 fev 2014.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*. 88, 39–49.
- Forestier, C., Champs, C., Vatoux, C., & Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research Microbiology*. 152(2), 167-173.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66, 365-378.
- Galindo, M.M., Schneider, N.Y., Stähler, F., Töle, J., & Meyerhof, W. (2012). Taste preferences. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 108, 383-426.

- Gilliland, S. E., & Speck, M. L. (1987). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 15-18.
- Han, C.H., Liu, J.C., Fang, S.U., & Hou, W.C. (2013). Antioxidant activities of the synthesized thiol-contained peptides derived from computer-aided pepsin hydrolysis of yam tuber storage protein, dioscorin. *Food Chemistry*. 138:923-30.
- Institute of Medicine – IOM (2005). Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, DC: National Academies Press. http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Energy/energy_full_report.pdf. Accessed 05 Mar 2014.
- Jheng, Y.J., Tsai, W.Y., Chen, K.H., Lin, K.W., Chyan, C.L., Yang, C.C., & Lin, K.C. (2012). Recombinant dioscorins of the yam storage protein expressed in *Escherichia coli* exhibit antioxidant and immunomodulatory activities. *Protein Expression and Purification*. 85(1),77-85.
- Klayraung, S., Viernstein, H., & Okonogi, S. (2009). Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*. 370(1/2), 54-60.
- Krammer, H.J., Von Seggern, H., Schaumburg, J., & Neumer, F. (2011). Effect of *Lactobacillus casei Shirota* on colonic transit time in patients with chronic constipation. *Coloproctology*, 33, 109-113.
- Kurmann, J. A., & Rasic, J. L. (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. In R. K. Robinson (Ed.), *Therapeutic properties of fermented milks* (pp. 117–158). London: Elsevier.
- Laudan, R. (1997). *The Food of Paradise: Exploring Hawaii's Culinary Heritage*. University of Hawaii Press. Hawaii.

- Lecerf, M.J. (2011). Prébiotiques, flore intestinale, inflammation, obésité. *Phytothérapie*, 9, 106-112.
- Levy, R.B., Claro, R.M., Mondini, L., Sichieri, R., & Monteiro, C.A. (2012). Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008-2009. *Revista de Saúde Pública*. 46(1), 6-15.
- Liserre, A.M., Franco, B.D.G.M, & Ré, M.I. (2007). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*. 21, 1-16.
- Luckow, T., & Delahunty, C. (2004). Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International*. 37, 805-814.
- Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G., & Delahunty C. (2006). Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite*. 47(3), 315-23.
- Martínez-Ruiz, N.R., López-Díaz, J.A., Wall-Medrano, A., Jiménez-Castro, J.A., & Ângulo, O. (2014). Oral fat perception is related with body mass index, preference and consumption of high-fat foods. *Physiology Behavior*. 129C, 36-42.
- Martins, E.M.F., Ramos A.M., Vanzela E.S.L., Stringheta P.C., Pinto C.L.O., & Martins, J.M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*. 51, 764–770.
- Mestres, C., Dorthe, S., Akissoé, N., & Hounhouigan, J.D. (2004). Prediction of sensorial properties (color and taste) of amala, a paste from yam chips flour of West Africa, through flour biochemical properties. *Plant Food for Human Nutrition*. 59(3), 93-99.
- Mirnejad, R., Vahdati, A.R., Rashidiani, J., Erfani, M., & Piranfar, V. (2013). The antimicrobial effect of lactobacillus casei culture supernatant against multiple drug resistant

clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. Iranian Red Crescent Medical Journal. 15(2), 122-6.

Nishimura, N., Tanabe, H., Yamamoto, T., & Fukushima, M. (2011). Raw Chinese yam (*Dioscorea opposita*) promotes cecal fermentation and reduces plasma non-HDL cholesterol concentration in rats. Journal of Nutrition Science and Vitaminology (Tokyo). 57(5), 340-7.

Oliveira, E.J., Soares, T.L., Barbosa, C.J., Santos-Filho, H.P., & Jesus, O.N. (2013).

Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. Revista Brasileira de Fruticultura. 35(2), 485-492.

Pereira, A.L.F., Maciel, T.C., & Rodrigues, S. (2011) Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. Food Research International. 44, 1276–1283.

Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., & Soccol, C.R. (2008). Trends in non-dairy probiotics beverages. Food Research International. 41(2), 111-123.

Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. Food Microbiology. 27, 1–11.

Santos, F.F., Almeida, M.A., Brumano, L.P., Pereira, M.S., Stringheta, P.C., & Pinto, M.A.O. (2011). Elaboração do relatório técnico-científico para registro de leites fermentados com alegação de propriedade funcional. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Nov/Dez, 383(66), 40-48.

Scarpellini, E., Campanale, M., Leone, D., Purchiaroni, F., Vitale, G., Lauritano, E.C., & Gasbarrini, A. (2010). Gut microbiota and obesity. Internal and Emergency Medicine. 5(1), S53-S56.

Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 8(2), 279–284.

- Soccol, C.R., Prado, F.C., & Parada, J.L. (2007). Technological process to produce a coconut fermented beverage with probiotic properties. BR patent PI0703244-7.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., & Spier, M.R. (2010). The Potential of Probiotics: a Review. *Food Technology and Biotechnology*. 48(4), 413-34.
- Vandenplas, Y., & Benninga, Y. (2009). Probiotics and Functional Gastrointestinal Disorders in Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48, S107-S109.
- Ventura, A.K., & Mennella, J.A. (2011). Innate and learned preferences for sweet taste during childhood. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 14(4), 379-84.
- Xiao, J., Wang, N.L., Sun, B., & Cai, G.P. (2010). Estrogen receptor mediates the effects of pseudoprotodiocsin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 299(1), C128-38.
- Zoppi, G., Cinquetti, M., Benini, A., Bonamini, E., & Minelli E.B. (2001). Modulation of the intestinal ecosystem by probiotics and lactulose in children during treatment with ceftriaxone. *Current Therapeutic Research Clinical and Experimental*, 62, 5, 418-435.

Figures

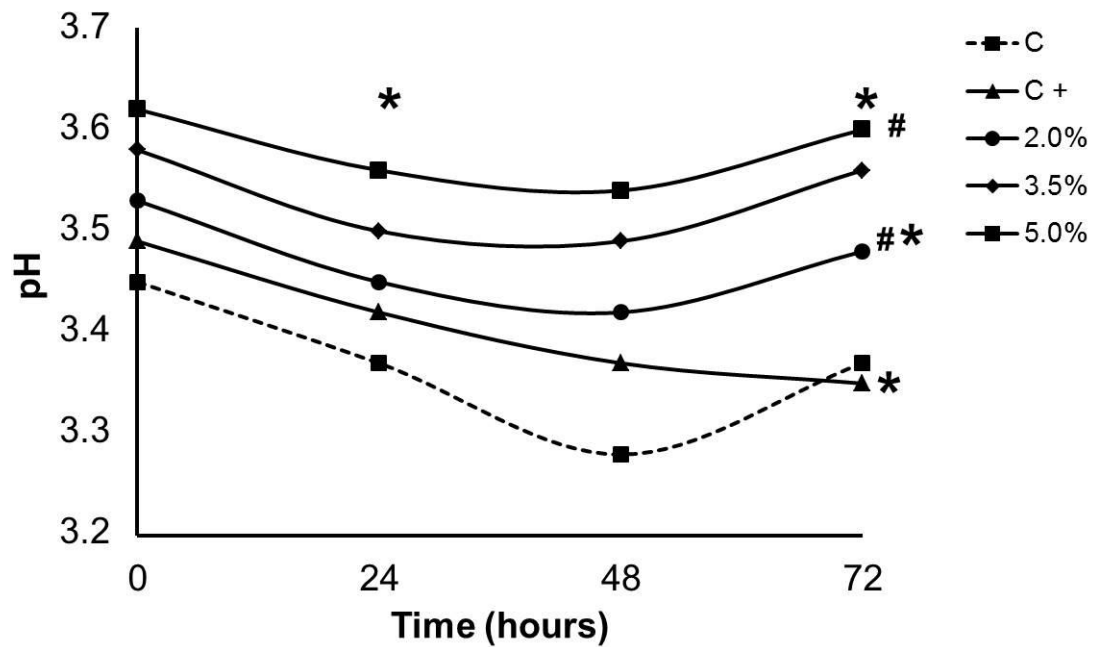


Figure 1: Variation in pH during fermentation of beverages.

C = control (juice only), C+ = positive control (juice added *L. casei*), 2.0, 3.5 and 5.0% indicates the concentration of yam flour (YF) in the beverage. Asterisks (*) in time axis indicate that no significant difference were found in values of time 24 and 72 for all samples ($p < 0.05$). Asterisks (*) in pH axis indicated no difference in the evolution of pH between samples and C + 2%. All other averages differ significantly ($p < 0.05$). The symbol # signifies that beverages with 2% and 5% of YF differ significantly ($p = 0.01$).

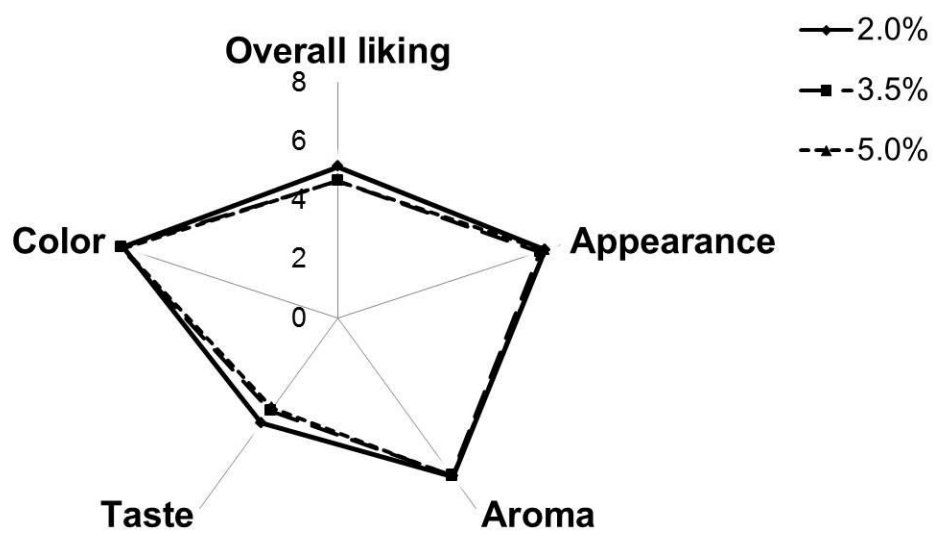


Figure 2: Radar graphic showing sensory profile of the three beverages samples of passion fruit contain 2.0, 3.5 and 5.0% of yam flour.

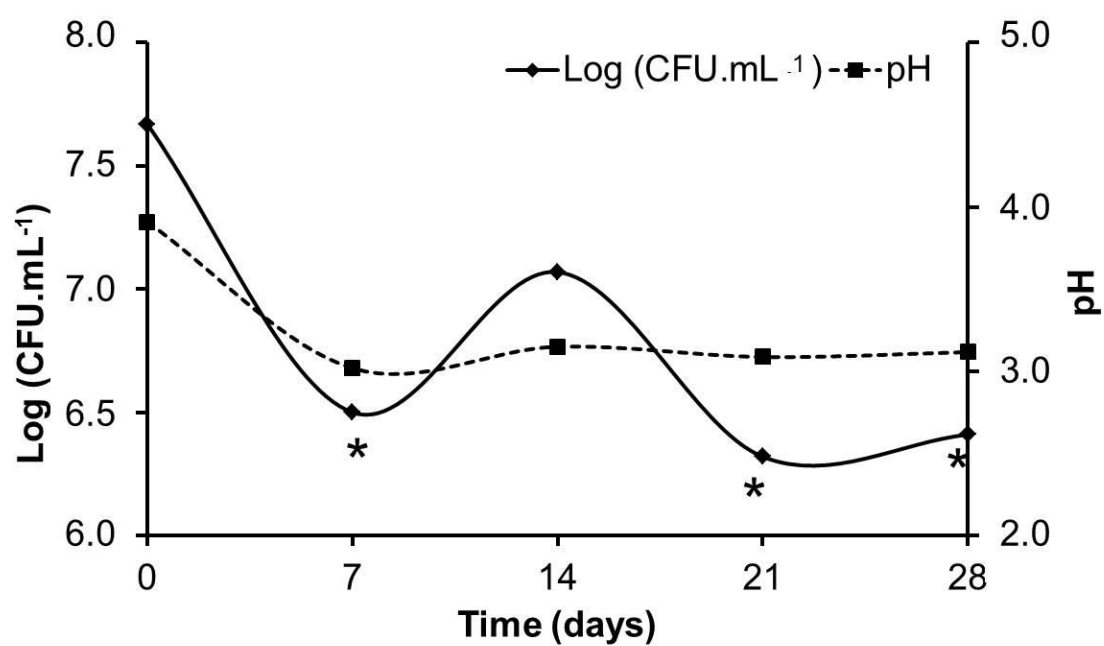


Figure 3: Variation in pH and count of CFU (LogCFU.mL⁻¹) of *L. casei* during shelf life.

Asterisks (*) indicated no significant difference between the values.

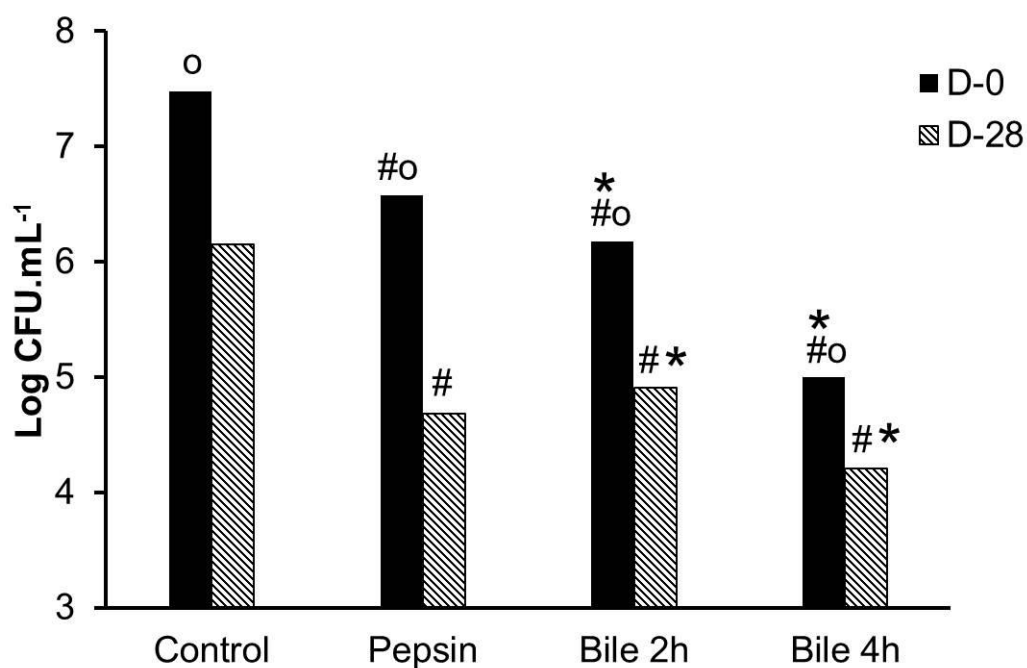


Figure 4: Resistance of *L. casei* to in vitro simulated gastrointestinal tract.

Count of CFU is showed in LogCFU.mL⁻¹ on the preparation of the beverages (D-0) and in the 28th day (D-28) of storage. Asterisks (*) indicated that samples differs significantly themselves in the same time. The symbol # indicated that samples differs significantly of control and the symbol O indicated that samples differs significantly with time ($p < 0.05$).

Tables

Table 1: Chemical analysis of yam flour (*Dioscorea cayennensis*)

Analysis	Yam Flour
	g.100 g⁻¹
Moisture	3.31
Ash	4.60
Protein	8.57
Lipid	0.61
Carbohydrate	81.68
Fiber	10.70
Starch	74.50
Sugars - total and reducing	Tr*
Total energy (Kcal)	366.53
pH	5.85
Acidity	2.24

*Tr - traits

Table 2: Chemical composition of functional beverages passion fruit flavor (*Passiflora edulis Sims*)

Analysis	Concentration of yam flour in the beverages		
	(g.100 g ⁻¹)		
	2.0%	3.5%	5.0%
Moisture	93.50	92.06	90.63
Ash	0.27	0.34	0.41
Protein	0.40	0.53	0.66
Lipid	0.21	0.22	0.23
Carbohydrate	5.62	6.85	8.07
Fiber	1.89	2.05	2.21
Total energy (Kcal)	25.97	31.5	36.99

Table 3: Index of acceptability (%) of passion fruit and yam flour beverages according to the analyzed sensory attributes

Attributes	Concentration of yam flour in the beverages		
	2.0%	3.5%	5.0%
Color	85.66 ^A	86.38 ^A	85.48 ^A
Appearance	82.44 ^A	80.65 ^A	82.26 ^A
Aroma	74.19 ^A	73.48 ^A	74.01 ^A
Taste	49.28 ^A	43.37 ^A	42.29 ^A
Overall liking	56.81 ^A	51.79 ^A	51.79 ^A

Means in the same line with the same superscript capital letter are not significantly different.

6.3 Artigo original 2

Artigo será submetido à revista **LWT- Food Science and Technology**

Título: Development and characterization of functional beverage of Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) fermented with *Lactobacillus casei*

Fator de impacto: 2.546

Qualis (nutrição): A1

Title:

Development and characterization of functional beverage of Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) fermented with *Lactobacillus casei*

Authors:

Cinthia Karla Rodrigues do **Monte-Guedes**^a

Emanuele Batista Barbosa da **Silva**^b

Thayza Christina Montenegro **Stamford**^c

Tânia Lúcia Montenegro **Stamford**^{*b}

*Corresponding author (see address below)

a - College of Nutrition – Federal University of Alagoas

b - Department of Nutrition – Federal University of Pernambuco

c - Department of Tropical Medicine – Federal University of Pernambuco

Address: Departamento de nutrição - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Cidade Universitária , S/Nº CEP: 50670901 - Recife, PE - Brasil

Telephone number: +55-81-21268463 Ramal: 8463

Fax number: (81) 21268473

e-mail: tlmstamford@yahoo.com.br

Abstract

The purpose of the present study was to produce a non-dairy probiotic beverage containing Pineapple and Yam Flour (YF), fermented with *L. casei*. The consumer acceptance, the feasibility in shelf life and the resistance of *L. casei* to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion were tested. The beverages were considered excellent sources of fiber. Sensory tests included analysis of acceptability, purchase intent and ranking of preference and show that most of the tasters do not approved and is not inclined to buy the beverages. The counts of *L. casei* were $> 10^7$ /mL during shelf life (28 days) and the microorganism showed resistance to *in vitro* gastrointestinal tract simulations. PF and YF together showed to be excellent raw materials to be tested in non-dairy probiotic products development, but further studies to improve acceptance beverages are required.

Keywords: *Lactobacillus casei*. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merril). Yam (*Dioscorea Caynnensis*). *In vitro* simulated gastrointestinal digestion.

Highlights

- The consumption of fermented dairy products is limited by some population groups
- Probiotic beverage (Pineapple and yam basis) was developed.
- Pineapple and yam have nutrients which promote the growth of *Lactobacillus casei*.
- The product shelf life was 28 days under refrigeration (10 ± 2 °C).
- *L. casei* was adapted to the beverage and resistance to simulated gastrointestinal tract in vitro during shelf life.

Abbreviations

0-D – The day of the preparation of the beverages

2.0, 3.5 and 5.0% - Concentration of yam flour

28-D – The 28th day of storage

C - Control beverage (juice only)

C+ - Positive control beverage (juice added *L. casei*)

FF - Functional food

L - Lipid

P – Protein

PB - Probiotics

PF - Passion Fruit

TC - Total carbohydrate

TE - Total Energy

YF - Yam Flour

1. Introduction

Probiotics are defined as live microorganisms that when administered in adequate amounts, are able to colonize the gastrointestinal tract conferring health benefits to the host FAO/WHO (2001). They probably represent the most typical class of functional foods (Pereira et al., 2011).

Functional foods (FF) are a food kind which grows approximately 5% per year worldwide (Granato et al., 2010). Fermented dairy products are the most common kind of FF used for probiotic intake (Shiby & Mishra, 2013).

Despite the benefits of inclusion of probiotics in food supply, its practical application has not implemented evenly, since individuals with food allergies or intolerances, especially dairy products, don't makes use of these FF (Pereira et al., 2011; Espírito-Santo et al., 2012). Besides, the great majority of disadvantaged populations cannot afford a dairy functional food (Espírito-Santo et al., 2014). The beverage formulation of vegetable origin has proved a viable alternative to overcome such difficulties (Yoon et al., 2006; Renuka et al., 2008).

The use of fruits and vegetables has been studded to substitute the dairy-based. Good-looking and good taste ally to excellent nutritional content suggest that vegetal can act as ideal media for probiotic growth (Luckow & Delahunty, 2004; Sheehan et al., 2007).

Previous studies indicate that sensory characteristics are the major factor influencing the acceptance of FF (Urala & Lahteenmaki, 2007). A strong off-flavor is developed after fermentation of vegetable-based beverages (Lucknow & Delahunty, 2004). For mask this uncommon flavor many fruit juices has been studded, such as pineapple (Sheehan et al., 2007).

The pineapple is a tropical fruit with higher cultivation in Brazil, due to its pleasant taste and aroma (Rogerio et al, 2007). The fruit is composed of almost complete fusion of 100-200

berries may present weight of 0.5 to 2.5 Kg. It is a fruit rich in sugars, in vitamins, especially the complex B, and C. It's is commonly eaten fresh, juice form or desserts (TACO, 2011, FAO, 2013).

A few functional properties as modulates intestinal absorption of lipids (Nishimura et al., 2011), act as a antiobesity agent (Xiao et al., 2010) and to have antioxidant and anti-inflammatory effects (Han et al, 2013; Chiu et al, 2013) are inherent to the yam tuber (*Dioscorea caynnensis*). The yam flour (YF) is the most common form of its processing (Mestres et al., 2004).

The purpose of the present study was to produce a non-dairy probiotic beverage containing Pineapple and YF, fermented with *L. casei*. The feasibility of the beverage, the acceptability and the resistance of *L. casei* to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion were checked.

2. Material and methods

2.1 Obtaining the tropical PA juice

The fruits were selected, weighed on an electronic scale, and washed in running water and sanitized in chlorinated water (200 ppm - 5 minutes). They were then rinsed in clean water and then peeled, cut and crushed in semi-industrial blender. To obtain the tropical juice pulp was diluted at a ratio of 55% for adequacy Brix (6.00), according to criteria established by Brazilian legislation for Tropical Juices (Brazil, 2003). No added sugar was used in the beverages.

2.2 Obtaining the YF (*Dioscorea cayennensis*)

The yam was washed and scorched in running water and sanitized in chlorinated water (150 ppm - 15 minutes). After peeling and slicing, have undergone bleaching, drying, crushing and pulverizing (unpublished results). The chemistry of the flour is shown in Table 1. The microbiological safety was tested negative for coliforms at 45 ° C, coagulase positive *staphylococci*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp/25g and molds and yeasts (AOAC, 2002).

TABLE 01 ABOUT HERE

2.3 Activation and viability of *L. casei*

L. casei subsp. *paracasei*. lyophilisate was inoculated in a selective medium for lactobacilli (MRS - Man, Rogosa and Sharpe) at 37 ° C for 72 hours under anaerobic conditions. The viability of the strains was tested by the multiple tube dilution procedure to 10^{-7} and 1 mL of substrate was inoculated onto MRS agar for depth at 37 ° C for 72 hours. The CFU count was performed on the plates.

2.4 Development of functional beverages by PA

Drinks were developed from addition of three different concentrations of YF (2.0%, 3.5% and 5.0%) into pineapple juice previously pasteurized (72°C – 5 min). The inoculum of *L. casei* was added to beverages at a concentration of 2%. The drinks were then kept at 27 ± 2 ° C for 48 hours for fermentation and then placed in the refrigerator at 10 ± 2 ° C. During fermentation, the pH range was monitored. Two controls C (juice only) and C+ positive control (juice added *L. casei*) were established.

2.5 Chemical composition and microbiological analyzes of beverages

Chemical composition of the beverages was established. Analyzes of moisture, protein (P), lipid (L), ash, total carbohydrate (TC) and fiber were performed. All analyzes were performed in triplicate and average values expressed in g/100g (AOAC, 1990). The total energy (TE) was calculated by the following equation: $TE = (TC \times 4) + (P \times 4) + (L \times 9)$.

Analyzes for the absence of coliforms at 45 ° C and *Salmonella* in 25 and 50 mL of the beverage were performed in triplicate (AOAC, 2002).

2.6 Sensory analysis of beverages

Sixty-three untrained tasters participated in the acceptance and preference tests. The sensory analyses were performed after approval by an Ethics Research Committee (protocol 15312113.2.0000.5208/2013). The samples were stored for 24 h at 10 ± 2 °C prior to the evaluation. 50 mL of the beverages, coded with three-digit random numbers placed on small white cups and served immediately after being taken out of the refrigerated storage.

The acceptance of appearance, color, taste, aroma, appearance and overall liking were evaluated on a 9-point hedonic scale, ranging from 1 (dislike very much) to 9 (like very much). Descending ordering drinks was requested, according to preference of the tasters. The

attitude of consumers regarding the purchase intention was assessed using a 5-point scale ranging from 1 (certainly not buy) to 5 (certainly buy).

The following analyses occurred at selected drink in sensorial analysis which contained 2% of YF.

2.7 Evaluation of shelf life

The shelf life consisted by viable bacteria count, pH, and biological stability (see item 2.5) at 0, 7, 14, 21 and 28 days of fermentation. For analysis of viable bacteria samples were treated as described in item 2.3. The colonies were counted and the results expressed as log CFU.mL⁻¹. The pH analysis was performed at potentiometer.

2.8 *L. casei* survival to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion

In vitro gastrointestinal digestion was performed by union and modification of methods of Liserre et al., 2007 and Santos et al., 2011. Tests were performed in quadruplicate. The control consisted of incubation of sample without pH change or enzyme addition. For verification of the resistance to simulated digestive process viability was tested by incubating the sample, after exposure, in MRS medium at 37 ° C for 72 hours under anaerobic conditions. The results are expressed as LogUFC.mL⁻¹. Analyzes occurred on the preparation of the beverages (0-D) and 28 days after (28-D). Sample was first diluted in saline 0.85% (1:9) and to measure the resistance to acid and pepsin (gastric phase) it's add to acidic solution of pepsin (3g/L; pH 2,5). The mixture was incubated in a shaking (150 rpm) at 37 °C for 120 minutes. To measure resistance to bile (enteric phase) it's add to basic solution of bovine bile (3g/L; pH 7,5). The mixture was incubated in a shaking (150 rpm) at 37 °C for 120 and 240 minutes.

2.9 Statistical Analysis

All assays were made in triplicate and the results were expressed as average of the assays. The results of bacterial count and sensory attributes were submitted to analysis of variance (ANOVA), considering YF concentration. Paired sample t-tests, at the 95% confidence interval ($p < 0.05$), were used for comparing hedonic means obtained for overall liking, appearance, aroma, taste and color in the session. Values are presented in the text as means or means $\pm$ standard deviations.

3. Results and Discussion

3.1 Beverages fermentation process

The fermentation of beverages was monitored over 72 hours. Table 2 shows that there was variation in pH thru time but a significant difference of the means was just saw from 48h of fermentation. It collaborates with data described in the literature (Pereira et al., 2011).

According the t test the control (C) and positive control (C+) samples do not differ significantly, but they are significant different from samples with 2.0, 3.5 and 5.0% of YF.

The beverage with 2% of YF presented different means values ($p < 0,05$) when compared with 3.5 and 5.0% beverages that behaved similarly.

Analysis of variance (ANOVA) showed a change in pH over time of fermentation, but no correlation was found in relation to concentration of YF. This is an interesting finding since it indicates the presence of YF does not alter the relative production of lactic acid by the *L. casei* metabolism. Positively YF may have added beneficial nutrients such as minerals, vitamins, dietary fibers, and antioxidants (Paula et al., 2012).

TABLE 2 ABOUT HERE

3.2 Chemical composition and microbiological analyzes of beverages

The chemical composition analysis of the beverages shows that they are rich in carbohydrates, with low calorific value and presents an excellent content of fiber (Table 3).

TABLE 3 ABOUT HERE

For a food to be considered an excellent source of fiber it must provide at least 20% of the recommended dietary fiber (Brownawell et al., 2012). Based on the recommendation of the Dietary Reference Intakes (IOM, 2005) which is 25g fiber / day for young adults, a food source must provide at least 5g of fiber in the portion. Thus all beverages in this study can be considered good sources of fiber as they provide 5.00 g (20 %), 5.28 g (21.12%) and 5.60 g (22,4%) in a portions of 200mL of beverages with 2.0%, 3.5% and 5.0% of YF respectively. The microbiological safety of the beverages was also tested, with negative results for all analyzes, indicating excellence in hygiene and sanitary measures taken to carry out the experiments.

3.3 Sensory analysis of beverages

63 untrained panelists participated in the sensory tests. The mean age was 22.9 ± 5.77 years, and the majority (73.0%) was female. Sensory tests included analysis of acceptability, purchase intent and ranking of preference. The sensory profile of the three pineapple and YF beverages can be seeing in Table 4.

The sensory attributes evaluated were color, taste, aroma, appearance and overall liking. The ANOVA indicated no variation between beverages, however the paired analysis showed significant differences in the perception of the attributes. The color and appearance overcame the aroma, taste and overall liking in scores. Color and appearance varied between “Indifferent” and “liked slightly” and aroma, taste and overall liking presented similar scores around “slightly disgusted”.

The appearance of off flavor in probiotic beverages of plant origin has been well reported in the literature (Luckow et al., 2006; Espírito-Santo et al., 2014). These being a major obstacle to the acceptance of these products and hence their inclusion in the market. In the present study the taste and aroma were responsible for the low acceptance of beverages.

No differences between beverages with 3.5 and 5.0% was related by panelists what is in accordance with our results in fermentation process who showing that 3.5 and 5.0% beverages behaved similarly.

The preference test corroborated these findings, indicating that a total of 44.4% of people stated prefer the beverage containing 2% of YF on the other detriment who obtained 30.2% and 25.4% of votes to the beverages containing 3.5 and 5.0% respectively. The texture may be the responsible for these results likewise the fact that beverages with 3.5 and 5.0% were considered statistically similar add to strengthen this hypothesis. Nelson (2001) reported that soluble fiber ingredients could provide texture modification.

In addition to this observations must be considered that the absence of added sugar may contribute much for not accepting beverages. The high sugar consumption is a common habit in Brazil, were the sensory tests occurred (Levy et al., 2012).

TABLE 4 ABOUT HERE

The mean of the scores assigned to the intention of buying the drinks were 2.17 ± 1.18 , 2.0 ± 1.10 and 1.75 ± 0.92 , respectively for drinks with a concentration of 2%, 3.5% and 5.0% of YF. Scores revolved around scale 2 (probably not buy), indicating that most of the tasters was not inclined to buy the beverages, showing that food consumption is strongly related to food's flavor. This association is already well reported in the literature (Ventura & Mennella, 2011; Galindo et al, 2012; Martínez-Ruiz et al, 2014).

3.4 Evaluation of shelf life

The drink had a more pronounced acceptability was added 2% YF, and is thus selected to evaluate stability over 28 days of storage.

Figure 1 shows the variation in pH and the count of lactic acid bacteria of the beverage during storage.

The pH remained almost constant throughout the storage period. No statistical difference was observed. This is a very interesting given once one of the challenges in the production of vegetable beverages probiotics is to maintain the viability and function of the microorganisms. Inserted into stable environment the microorganisms have higher chance of survival (Mattila-Sandholm et al., 2002; Champagne et al 2005). This hypothesis could be tested by analyzing the amount of microorganisms in the beverages in 28 days of storage. The count of lactic acid bacteria was carried out on days 0, 7, 14, 21 and 28 days storage and showed 9.39, 8.72, 9.36, 8.71 and 8.95 LogUFC.mL⁻¹, respectively. A growth diauxic curve of *L.casei* could be seeing in Figure 1. The statistic show no difference in the count of CFU in the days 0 and 14 (O) and in the days 7 and 21(*), showing a positive effect of diauxic behavior in the shelf life of the beverage, which until 14 days of storage had the same value of viable lactobacilli that found on the preparation. In the 28th day beverages presents the same quantity of viable lactobacilli founded on the 7th day of storage.

These results are sufficient to demonstrate not only the survival of the *L. casei* but their multiplication during the storage, showing that pineapple and yam can be used as substrates, as already shown in other studies with raw materials of vegetable origin (Sheehan et al., 2007; Pereira et al., 2011; Antunes et al., 2013).

Support our data the addition of rice to enhance a soy-based beverage has been reported. Rice works as raw material rich in carbohydrate as the FY. The addition is considered a cheap way to increase the energy value (Sabanis et al., 2009).

The excellent adaptation of *L. casei* still reflects its probiotic effect since during the whole storage period it presented the CFU count of 10⁷/mL, higher than the required value to exert

positive effects on the body that range between 10^6 and 10^9 CFU/g or mL (Abadia-Garcia et al., 2013).

FIGURA 1 ABOUT HERE

3.5 Resistance to simulated gastrointestinal tract in vitro by *Lactobacillus*

The mean counts of *L. casei* obtained at times 0 and 28 days are shown in Figure 2. The average values were 8.80, 6.90, 7.52 and 6.14 LogUFC.mL⁻¹ for Control, Pepsin, Bile 2h and Bile 4h treatments on the preparation of beverages (D-0), respectively, and 8.72, 6.80, 6.73 and 5.18 LogUFC.mL⁻¹ for Control, Pepsin, Bile 2h and Bile 4h treatments on the 28th day of storage (D-28), respectively.

There was no significant difference in the count of microorganisms in the control group at time D-0 and D-28. Statistical analysis showed that all treatments in both periods differed significantly from control (#), the same applies for Bile 2h and 4h (*) treatments. The count on D-28 was lower than in the D-0 for all treatments (O) ($p < 0.05$).

The viability of probiotics is an important factor to ensure their ability to promote health and wellness (FAO/WHO, 2002). Not survive the acidic environment of the stomach and the attack of bile are the main factors for the decrease the viability of probiotic microorganisms (Klayraung et al., 2009; Begley et al., 2005).

The results of the current study demonstrate that the *L. casei* was able to resist simulation of the gastrointestinal tract in vitro viability. Counts the order of 10^6 for all treatments with the exception to treatments with bile for 4 hours that present counts the order of 10^5 .

These data corroborate the hypothesis that the pineapple supplemented with YF is a good alternative for adaptation of LC in probiotic products of plant origin (Costa et al., 2013).

FIGURE 1 ABOUT HERE

4. Conclusions

The development of vegetal beverages with probiotic is an alternative to substitute dairy products in diet. The excellent resistance of *L. casei* during shelf life associate to its resistance to in vitro gastrointestinal tract simulations link the Pineapple and YF as promising alternatives. Further studies to improve acceptance beverages are required.

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Abadía-García, L., Cardador, A., Campo, S., Arvízu, S., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C. García-Almendarez, B., & Amaya-Llano, S.L.(2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33, 191-197.
- Antunes A.E.C., Liserre A.M., Coelho A.L.A., Menezes C.R., Moreno I., Yotsuyanagi K., & Azambuja N.C. (2013). Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. *LWT - Food Science and Technology*. 54, 125-131.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (2002). *Official methods of analysis*, 13^a ed. Washington.
- Begley M., Gahan C.G.M., & Hill C. (2005). The interaction between bacteria and bile.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003). Instrução normativa N° 12, de 4 de setembro de 2003. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultaLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Accessed 19 de abr de 2013.
- Brownawell, A.M., Caers, W., Gibson, G.R., Kendall, C.W.C., Lewis, K.D., Ringel, Y., & Slavin, J.L. (2012). Prebiotics and the Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research, and Goals. *The Journal of Nutrition*. doi: 10.3945/jn.112.158147.
- Champagne C. P., Roy D., & Gardner N. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61–84.
- Chiu, C.S., Deng, J.S., Chang, H.Y., Chen, Y.C., Lee, M.M., Hou, W.C., Lee, C.Y., Huang, S.S., & Huang, G.J. (2013) Antioxidant and anti-inflammatory properties of Taiwanese yam

(*Dioscorea japonica* Thunb. var. *pseudojaponica* (Hayata) Yamam.) and its reference compounds. Food Chemistry. 15, 141(2), 1087-96. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.031.

Costa M.G.M., Fonteles T.V., Jesus A.L.T., & Rodrigues S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. Food Chemistry. 139, 261–266.

Espírito-Santo A. P., Cartolano N. S., Silva T. F., Soares F. A. S. M., Gioielli L. A., Perego P., Converti, A., & Oliveira, M.N. (2012). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acids profile and increase CLA content in yogurts. International Journal of Food Microbiology, 154, 135–144.

Espirito-Santo A.P, Mouquet-Rivier, C., Humblot, C., Cazevieille, C., Icard-Vernière, C., Soccol, C.R., & Guyot, J.P. (2014). Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. Food Research International. 57, 104–113.

Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO. (2013). Faostat. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Accessed 07 fev 2014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization - FAO/WHO (2001). Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Accessed 02 Fev 2014.

Galindo, M.M., Schneider, N.Y., Stähler, F., Töle, J., & Meyerhof, W. (2012). Taste preferences. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 108, 383-426.

- Granato D., Branco G. F., Nazzaro F., Cruz A. G., & Faria J. A. F. (2010). Functional food and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292–302.
- Han, C.H., Liu, J.C., Fang, S.U., & Hou, W.C. (2013). Antioxidant activities of the synthesized thiol-contained peptides derived from computer-aided pepsin hydrolysis of yam tuber storage protein, dioscorin. *Food Chemistry*. 138:923-30.
- Institute of Medicine – IOM (2005). Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, DC: National Academies Press. http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Energy/energy_full_report.pdf. Accessed 05 Mar 2014.
- Klayraung S., Viernstein H., & Okonogi S. (2009). Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*. 370(1/2), 54-60.
- Levy, R.B., Claro, R.M., Mondini, L., Sichieri, R., & Monteiro, C.A. (2012). Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008-2009. *Revista de Saúde Pública*. 46(1), 6-15.
- Liserre, A.M., Franco, B.D.G.M, & Ré, M.I. (2007). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*. 21, 1-16.
- Luckow, T., & Delahunty, C. (2004). Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International*. 37, 805-814.
- Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G., & Delahunty C. (2006). Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite*. 47(3), 315-23.

- Martínez-Ruiz N.R., López-Díaz J.A., Wall-Medrano A., Jiménez-Castro J.A., & Ângulo O. (2014). Oral fat perception is related with body mass index, preference and consumption of high-fat foods. *Physiology Behavior*. 129C, 36-42.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12, 173-182
- Mestres, C., Dorthe, S., Akissoé, N., & Hounhouigan, J.D. (2004). Prediction of sensorial properties (color and taste) of amala, a paste from yam chips flour of West Africa, through flour biochemical properties. *Plant Food for Human Nutrition*. 59(3), 93-99.
- Nelson AL. (2001). High-fibre ingredients: practical guides for the food industry. St. Paul, MN: Eagan Press, p. 25.
- Nishimura, N., Tanabe, H., Yamamoto, T., & Fukushima, M. (2011). Raw Chinese yam (*Dioscorea opposita*) promotes cecal fermentation and reduces plasma non-HDL cholesterol concentration in rats. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology (Tokyo)*. 57(5), 340-7.
- Paula CD, Pirozi M, Puiatti M, B JT, & Durango AM (2012) Características físico-químicas e morfológicas de rizóforos de inhame (*Dioscorea alata*). *Bio Sec Agro Agroi* 10(2):61-70
- Pereira, A.L.F., Maciel, T.C., & Rodrigues, S. (2011) Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*. 44, 1276–1283.
- Renuka, B., Kulkarni, P., & Prapulla, S.G. (2008). Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: effect on the quality characteristics. *LWT – Food Science and Technology*, 42 (5), 1031-1033.
- Rogério, M.C.P., Borges, I., Neiva, J.N.M., Rodriguez, N.M., Pimentel, J.C.M., Martins, G.A., Ribeiro, T. P., Costa, J.B., Santos, S.F., & Carvalho, F.C. (2007). Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananas comosus L.*) em dietas para ovinos. 1.

Consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(3), 773-781.

Sabanis D., Lebesi D., & Tzia C. (2009). Development of fibre-enriched gluten-free bread: a response surface methodology study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60 Suppl 4, 174-90.

Santos, F.F., Almeida, M.A., Brumano, L.P., Pereira, M.S., Stringheta, P.C., & Pinto, M.A.O. (2011). Elaboração do relatório técnico-científico para registro de leites fermentados com alegação de propriedade funcional. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. Nov/Dez, 383(66), 40-48.

Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.

Shiby V.K., & Mishra H.N. (2013). Fermented milks and milk products as functional foods--a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(5), 482-96.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. NEPA-UNICAMP.- Versão III. 2. ed. Campinas, SP, 2011.

Urala, N., & Lahteenmaki, L. (2007). Consumers' changing attitudes towards functional foods. *Food Quality and Preference*, 18, 1-12.

Ventura A.K., & Mennella J.A. (2011). Innate and learned preferences for sweet taste during childhood. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 14(4), 379-84.

World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: World Health Organization; 2002. (WHO Technical Report Series, 916), 14.

Xiao, J., Wang, N.L., Sun, B., & Cai, G.P. (2010). Estrogen receptor mediates the effects of pseudoprotodiocsin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 299(1), C128-38.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E., & Hang, Y.D.(2006). Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 97, 1327-1430.

Figures

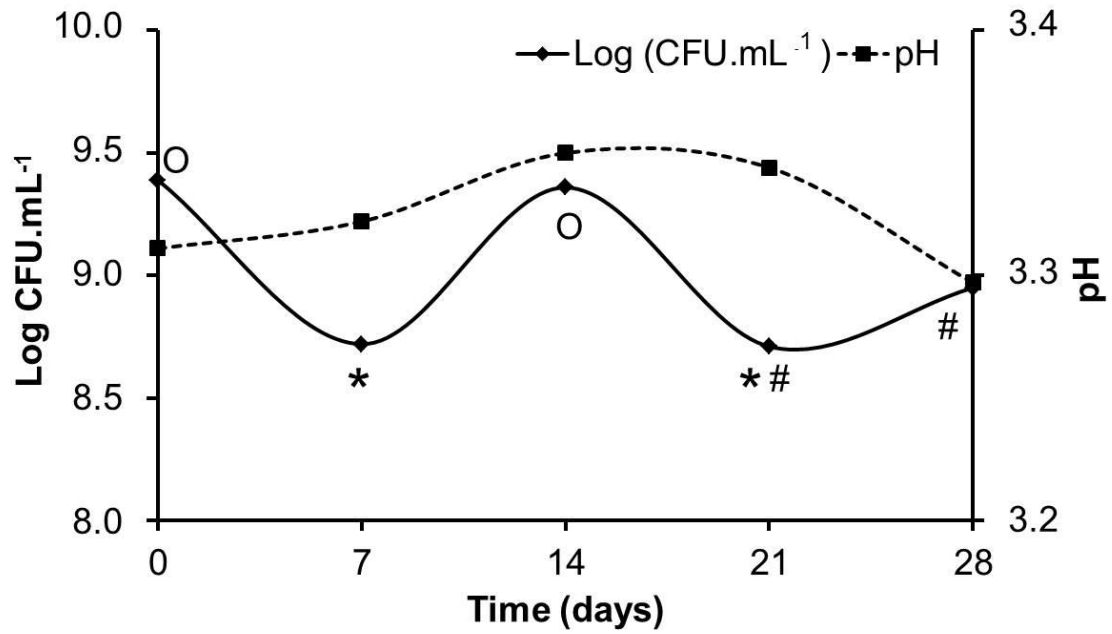


Figure 1: Variation in pH and count of CFU (LogCFU.mL⁻¹) of *L. casei* during shelf life.

Asterisks (*) and the symbol O indicated no significant difference between the values. The symbol # indicated no significant differences between the values.

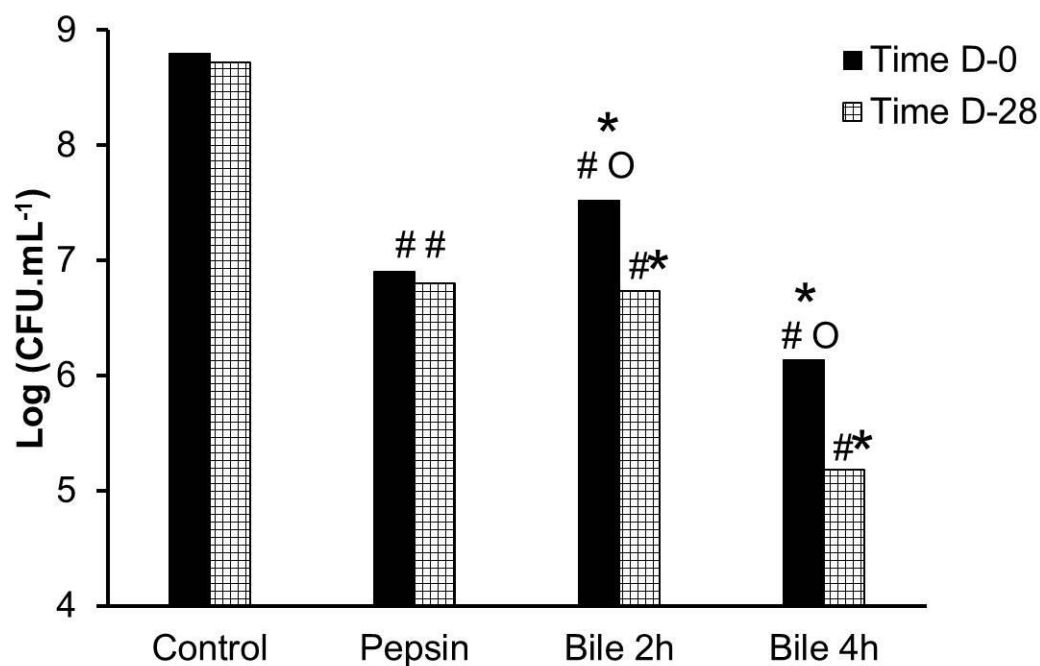


Figure 2: Resistance of *L. casei* to in vitro simulated gastrointestinal tract.

Count of CFU is showed in LogUFC.mL⁻¹ on the preparation of the beverages (D-0) and in the 28th day (D-28) of storage. The symbol # indicated that samples differs significantly of control. The symbol O indicated that samples differs significantly with time ($p < 0.05$). and asterisks (*) indicated that samples differs significantly themselves in the same time.

Tables

Table 1: Chemical analysis of yam flour (*Dioscorea cayennensis*)

Analysis	Yam Flour
	g.100 g⁻¹
Moisture	3.31
Ash	4.60
Protein	8.57
Lipid	0.61
Carbohydrate	81.68
Fiber	10.7
Starch	74.5
Sugars - total and reducing	Tr*
Total energy (Kcal)	366.53
pH	5.85
Acidity	2.24

*Tr - traits

Table 2: Variation in pH during fermentation of pineapple and yam flour beverages

Time (hours)	Controls and beverages with different concentration of yam flour				
	C	C +	2.0%	3.5%	5.0%
0	3.73 ^{Aa}	3.80 ^{Aa}	3.90 ^{Ab}	3.96 ^{Ac}	4.00 ^{Ac}
24	3.67 ^{Aa}	3.74 ^{Aa}	3.81 ^{Ab}	3.85 ^{Ac}	3.89 ^{Ac}
48	3.27 ^{Ba}	3.20 ^{Ba}	3.26 ^{Bb}	3.33 ^{Bc}	3.39 ^{Bc}
72	3.09 ^{Ca}	3.05 ^{Ca}	3.16 ^{Cb}	3.23 ^{Cc}	3.21 ^{Cc}

C (juice only) and C+ (juice added *L. casei*) indicates the controls groups. 2.0%, 3.5% and 5.0% indicates the yam flour concentration in the beverages. A–C For each trial, means in the same column with different superscript capital letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test. a–c For each trial, means in the same line with different superscript lowercase letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test.

Table 3: Chemical composition of functional three pineapple and yam flour beverages

Analysis	Concentration of yam flour in the beverages		
	(g.100 g ⁻¹)		
	2.0%	3.5%	5.0%
Moisture	91,91	90,64	89,21
Ash	0,13	0,20	0,27
Protein	0,29	0,42	0,55
Lipid	0,25	0,26	0,27
Carbohydrate	7,25	8,48	9,70
Fiber	2.50	2.64	2.80
Total energy (Kcal)	33,49	37,94	43,43

Table 4: Sensory profile of the three pineapple and yam flour beverages

	2.0%	3.5%	5.0%
Color	5.98±2.12 ^{Aa}	6.08±1.90 ^{Ab}	5.85±2.07 ^{Ab}
Appearance	6.05±2.14 ^{Aa}	6.00±1.97 ^{Ab}	5.87±2.00 ^{Ab}
Aroma	3.57±1.94 ^{Ba}	3.53±1.89 ^{Bb}	3.47±2.03 ^{Bb}
Taste	4.03±2.29 ^{Ba}	3.83±1.95 ^{Bb}	3.30±2.04 ^{Bb}
Overall liking	4.33±2.14 ^{Ba}	4.30±1.96 ^{Bb}	4.00±2.12 ^{Bb}

2.0%, 3.5% and 5.0% indicates the yam flour concentration in the beverages. The results are showing as means ± standard deviations. A–B For each trial, means in the same column with different superscript capital letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test. a-b For each trial, means in the same line with different superscript lowercase letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test.

6.4 Artigo original 3

Artigo será submetido à revista **Bioresource Technology**

Título: Functional Mango (*Mangifera indica* L.) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) beverage fermented with *Lactobacillus casei*

Fator de impacto: 4.750

Qualis (nutrição): A1

Title:

Functional Mango (*Mangifera indica* L.) and Yam (*Dioscorea caynnensis*) beverage fermented with *Lactobacillus casei*

Authors:

Cinthia Karla Rodrigues do **Monte-Guedes**^a

Andrei Felipe Loureiro do Monte **Guedes**^b

Thayza Christina Montenegro **Stamford**^{*c}

Tânia Lúcia Montenegro **Stamford**^d

*Corresponding author (see address below)

a - College of Nutrition – Federal University of Alagoas

b - Institute of Chemistry and Biotechnology - Federal University of Alagoas

c - Department of Tropical Medicine – Federal University of Pernambuco

d - Department of Nutrition – Federal University of Pernambuco

Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical. Avenida Professor Moraes Rêgo s/n - Cidade Universitária – CEP: 50740520 - Recife, PE - Brasil

Telephone number: +55-81-21268528

e-mail: thayzastamford@yahoo.com.br

Abstract

The aim of the present study was to produce a non-dairy probiotic beverage containing Mango and yam flour (YF), fermented with *L. casei*. The consumer acceptance, the feasibility in shelf life and the resistance of *L. casei* to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion were tested. The beverages were considered good sources of fiber. Sensory tests included analysis of acceptability, purchase intent and ranking of preference and show that most of the tasters do not approved the beverages because of its off flavor. The counts of *L. casei* were $> 10^7$ /mL during shelf life (28 days) and the microorganism showed resistance to *in vitro* gastrointestinal tract simulations. Mango and YF together showed to be excellent raw materials to be tested in non-dairy probiotic products development, but further studies to improve acceptance beverages are required.

Keywords: *Lactobacillus casei*. Mango (*Mangifera indica* L.). Yam (*Dioscorea Caynnensis*). *In vitro* simulated gastrointestinal digestion.

Highlights

- The production of non-dairy products with probiotic is limited.
- A probiotic vegetal beverage with mango yam flour was developed.
- The *Lactobacillus casei* grown appropriate in the medium.
- The product shelf life was 28 days under refrigeration (10 ± 2 °C).
- Low acceptance of the drink was found because of its uncommon flavor
- *L. casei* was adapted to the beverage and resistance to simulated gastrointestinal tract in vitro during shelf life.

Abbreviations

0-D – The day of the preparation of the beverages

2.0, 3.5 and 5.0% - Concentration of yam flour

28-D – The 28th day of storage

C - Control beverage (juice only)

C+ - Positive control beverage (juice added *L. casei*)

FP - Functional products

L - Lipid

P – Protein

TC - Total carbohydrate

TE - Total Energy

YF - Yam Flour

1. Introduction

Historically microbes play an important role as basis for human food production. Fermentation is one of the more used techniques to improve preservation (Vlieg et al., 2011). According to the Food and Agriculture organization (FAO/ WHO, 2001) the probiotics are defined as live microorganisms that when administered in adequate amounts, are capable to colonize the gastrointestinal tract conferring health benefits to the host. It's probably representing the most typical class of functional foods (Pereira et al., 2011).

The species *Lactobacillus casei* is often founded in functional products (FP) and its associated with beneficial effects such as stimulation of the immune system and relief of Crohn's disease symptoms (Itsaranuwat et al., 2003). *L. casei* is also related as resistant to stress situations as hard medium to survive (Yoon et al., 2006; Sheehan et al., 2007).

The majority of FP containing *L. casei* are dairy based since it is well reported in the literature the difficulty of developing products of plant origin with probiotic characteristics (Espírito-Santo et al., 2011). The inclusion of probiotics in diet is hampered by these technological impasses. In addition individuals with food allergies or intolerances, especially dairy products, don't makes use of these FP (Pereira et al., 2011; Espírito-Santo et al., 2012).

The good-looking and good taste presented by the fruits ally to excellent nutritional content suggest that these vegetal can act as ideal media for probiotic growth (Luckow & Delahunty, 2004; Sheehan et al., 2007). Meantime previous studies indicate that sensory characteristics of vegetable probiotic beverages are the major factor influencing its acceptance (Lucknow & Delahunty, 2004).

According Luckow et al. (2006) one of the most efficient ways to mask the off-flavor produced in vegetal fermentation is the use of tropical fruit juices with pronounced flavor.

The mango (*Mangifera indica* L.) is a tropical fruit of the most consumed in the world. is a fleshy and full fruit with pronounced flavor and aroma. The fruit is a good source of vitamin A and is commonly eaten fresh or in juice form (TACO 2011, FAO 2013).

Yam (*Dioscorea caynensis*) is a very popular tuber in Brazil and African countries. It has been associated to functional properties such as act as a natural anti-inflammatory (Fu et al, 2009; Yeh et al., 2013), antiobesity agent (Xiao et al., 2010) and have antioxidant effect (Han et al, 2013). The yam flour (YF) is the most common form to add functional properties as supplementation (Laudan, 1997; Mestres et al., 2004).

The purpose of the present study was to produce a non-dairy probiotic beverage containing mango and YF, fermented with *L. casei*. The feasibility of the beverage, the acceptability and the resistance of *L. casei* to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion were checked.

2. Material and methods

2.1 Obtaining the tropical MA juice

The fruits were selected, weighed on an electronic scale, washed in running water and sanitized in chlorinated water (200 ppm - 5 minutes). They were then rinsed in clean water and then peeled, cut and crushed in semi-industrial blender. To obtain the tropical juice pulp was diluted at a ratio of 35%. No added sugar was used in the beverages.

2.2 Obtaining the YF (*Dioscorea cayennensis*)

The yam was washed and scorched in running water and sanitized in chlorinated water (150 ppm - 15 minutes). After peeling and slicing, have undergone bleaching, drying, crushing and pulverizing (unpublished results). The chemistry of the flour is shown in Table 1. The microbiological safety was tested negative for coliforms at 45 ° C, coagulase positive *staphylococci*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp/25g and molds and yeasts (AOAC, 2002).

TABLE 01 ABOUT HERE

2.3 Activation and viability of *L. casei*

L. casei subsp. *paracasei*. lyophilisate was inoculated in a selective medium for lactobacilli (MRS - Man, Rogosa and Sharpe) at 37 ° C for 72 hours under anaerobic conditions. The viability of the strains was tested by the multiple tube dilution procedure to 10^{-7} and 1 mL of substrate was inoculated onto MRS agar for depth at 37 ° C for 72 hours. The CFU count was performed on the plates.

2.4 Development of functional beverages by MA and YF

Beverages were developed from addition of three different concentrations of YF (2.0%, 3.5% and 5.0%) into mango juice previously pasteurized (72°C – 5 min). The inoculum of *L. casei* was added to beverages at a concentration of 2%. The drinks were then kept at 27 ± 2 ° C for 48 hours for fermentation and then placed in the refrigerator at 10 ± 2 ° C. During fermentation, the pH range was monitored. Two controls C (juice only) and C+ positive control (juice added *L. casei*) were established.

2.5 Chemical composition and microbiological analyzes of beverages

Chemical composition of the beverages was established. Analyzes of moisture, protein (P), lipid (L), ash, total carbohydrate (TC) and fiber were performed. All analyzes were performed in triplicate and average values expressed in g/100g (AOAC, 1990). The total energy (TE) was calculated by the following equation: $TE = (TC \times 4) + (P \times 4) + (L \times 9)$.

Analyzes for the absence of coliforms at 45 ° C and *Salmonella* in 25 and 50 mL of the beverage were performed in triplicate (AOAC, 2002).

2.6 Sensory analysis of beverages

59 untrained tasters participated in the acceptance and preference tests. The sensory analyses were performed after approval by an Ethics Research Committee (protocol 15312113.2.0000.5208/2013). The samples were stored for 24 h at 10 ± 2 °C prior to the evaluation. 50 mL of the beverages, coded with three-digit random numbers placed on small white cups and served immediately after being taken out of the refrigerated storage.

The acceptance of appearance, color, taste, aroma, appearance and overall liking were evaluated on a 9-point hedonic scale, ranging from 1 (dislike very much) to 9 (like very much). Descending ordering drinks was requested, according to preference of the tasters. The

attitude of consumers regarding the purchase intention was assessed using a 5-point scale ranging from 1 (certainly not buy) to 5 (certainly buy).

The following analyses occurred at selected beverage in sensorial analysis which contained 2% of YF.

2.7 Evaluation of shelf life

The shelf life consisted by viable bacteria count, pH, and biological stability (see item 2.5) at 0, 7, 14, 21 and 28 days of fermentation. For analysis of viable bacteria samples were treated as described in item 2.3. The colonies were counted and the results expressed as log CFU.mL⁻¹. The pH analysis was performed at potentiometer.

2.8 *L. casei* survival to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion

In vitro gastrointestinal digestion was performed by union and modification of methods of Liserre et al., 2007 and Santos et al., 2011. Tests were performed in quadruplicate. The control consisted of incubation of sample without pH change or enzyme addition. For verification of the resistance to simulated digestive process viability was tested by incubating the sample, after exposure, in MRS medium at 37 ° C for 72 hours under anaerobic conditions. The results are expressed as LogUFC.mL⁻¹. Analyzes occurred on the preparation of the beverages (0-D) and 28 days after (28-D). Sample was first diluted in saline 0.85% (1:9) and to measure the resistance to acid and pepsin (gastric phase) it's add to acidic solution of pepsin (3g/L; pH 2,5). The mixture was incubated in a shaking (150 rpm) at 37 °C for 120 minutes. To measure resistance to bile (enteric phase) it's add to basic solution of bovine bile (3g/L; pH 7,5). The mixture was incubated in a shaking (150 rpm) at 37 °C for 120 and 240 minutes.

2.9 Statistical Analysis

All assays were made in triplicate and the results were expressed as average of the assays. The results of bacterial count and sensory attributes were submitted to analysis of variance (ANOVA), considering YF concentration. Paired sample t-tests, at the 95% confidence interval ($p < 0.05$), were used for comparing hedonic means obtained for overall liking, appearance, aroma, taste and color in the session. Values are presented in the text as means or means $\pm$ standard deviations.

3. Results and Discussion

3.1 Beverages fermentation

The fermentation of beverages was monitored over 72 hours. Table 2 shows the variation in pH during fermentation. pH variation occur thru time but only from 48 hours a significant difference of the means could be saw. Posterior data indicate the same time to check for differences (Pereira et al., 2011).

According the ANOVA the pH change occurred in relation to time, but not in relation to the concentration of YF beverages. This found could indicate that the YF supplementation in the concentrations used do not interfered in *L. casei* adaptation in the medium. Additively we believe that the YF addiction help the *L. casei* adaptation once in the pilot tests more UFC was count when the medium was enriched with YF (data not show). Probably beneficial nutrients and effects was added with YF addiction (Xiao et al., 2010; Yeh et al, 2013; Han et al., 2013).

TABLE 2 ABOUT HERE

3.2 Chemical composition and microbiological analyzes of beverages

The chemical composition analysis of the mango and YF beverages shows that they are rich in carbohydrates, with low calorific value and presents an excellent content of fiber (Table 3).

TABLE 3 ABOUT HERE

According the Brazilian Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) The presence of fibers in adequate amounts (1.5g and 3.0g per serving to liquid and solid food, respectively)

confer functional properties to food (ANVISA, 2008). All beverages developed in the current study can be considered source of fiber, once they presented 1.84, 2.03 and 2.19 g of fibers in a portion of 100ml respectively to beverages with 2.0%, 3.5% and 5.0% of YF. Based on the recommendation of the Dietary Reference Intakes (DRIs, 2005) which is 25g fiber / day for young adults we observed that in a common portion of drinks (200ml) a percentage of 14.7, 16.2 and 17.5 is supplied by beverages with 2.0%, 3.5% and 5.0% of YF respectively.

By the analysis we are able to affirm that all beverages can be considered as a good source of fiber (Brownawell et al., 2012).

The microbiological safety of the beverages was also tested, with negative results for all analyzes, indicating excellence in hygiene and sanitary measures taken to carry out the experiments.

3.3 Sensory analysis of beverages

59 untrained panelists participated in the sensory tests to evaluate the developed beverages.

The mean age of the judges was 23.05 ± 5.87 years, and 72.9% was female. Sensory tests included analysis of acceptability, purchase intent and ranking of preference. The sensory profile of the three mango and YF beverages can be seen in Table 4.

The sensory attributes evaluated were color, taste, aroma, appearance and overall liking.

The ANOVA indicated no variation between beverages when the concentration of YF was taken in count. Differences appear only when the attributes were analyzed separately by t-test.

Color and appearance were judged as no differences with grades ranging between 6.85 and 7.44. These attributes have obtained satisfactory grades, demonstrating a good product acceptance to the aspects analyzed. On the other hand, aroma, taste and overall liking presented very low grades ranging between 3.05 and 3.98. These results indicate that the

acceptance is closely related to aspects of flavor since overall liking showed no significant difference when compared with those attributes.

The development of “off flavor” in fermented beverages of plant origin has been well reported in the literature (Luckow et al., 2006; Espírito-Santo et al., 2012). This has been a major obstacle to the acceptance of these products and hence their inclusion in the market. Strategies as choose fruits with pronounced flavor are reported as a way to disguise the off flavor (Luckow et al., 2006). The microencapsulation of the probiotics is another way to improve the acceptance (Antunes et al., 2013; Martins et al., 2013).

The preference test indicating that a total of 42.4% of judges stated prefer the beverage containing 2% of YF on the other detriment of beverages containing 3.5 and 5.0% of YF. The texture and more smooth taste of the beverage containing 2.0% of YF may be responsible for these results even though the drinks are not considered different from each other by ANOVA. According to Shah (2007) microbial survival in foods is strongly dependent on the food matrix. Probably the biggest offer of substrate should stimulate microbial growth because of the fact that carbohydrates are consumed during the fermentation (Costa et al., 2013). So the increase of metabolites production takes to greater sensory change in product.

The high sugar consumption is a common habit around the world. Brazil, where the sensory tests occurred, is one of the countries pass by an epidemiological transition and the sugar consumption is consider high (Levy et al., 2012). The absence of added sugar may contribute much for not accepting beverages.

TABLE 4 ABOUT HERE

The mean of the scores assigned to the intention of buying the drinks were 1.95 ± 1.21 , 1.85 ± 1.11 and 1.85 ± 1.06 , respectively for drinks with a concentration of 2%, 3.5% and 5.0% of

YF. Scores show that the judges probably has no intention to buy the beverages, regardless of its formulation. This is a valid association since the relationship between flavor and acceptability are well described in the literature (Ventura & Mennella, 2011; Galindo et al, 2012; Martínez-Ruiz et al, 2014).

The beverage with more pronounced acceptability was the one added with 2% of YF. The following analysis were performed with it.

3.4 Evaluation of shelf life

The stability of 2% YF and mango beverage was evaluated over 28 days of storage. Figure 1 shows the variation in pH and the count of lactic acid bacteria (Log CFU.mL⁻¹) during the 28 days of storage

A slight change in pH can be viewed. The symbol # indicates that the values on days 7, 14 and 21 did not differ statistically ($p > 0.05$). The stability observed over these 14 days suggest that the *L. casei* was adapted to medium. This is a *sine qua non* condition to microorganism survival (Champagne et al., 2005; Vodnar & Socaciu, 2014). This hypothesis could be tested by analyzing the amount of microorganisms in the beverages in 28 days of storage. The count of lactic acid bacteria was carried out on days 0, 7, 14, 21 and 28 days storage and showed 9.35, 8.67, 9.33, 8.74 and 9.14 LogUFC.mL⁻¹, respectively. Figure 1 show the growth behavior, characteristic of a diauxic curve. No difference in the count of CFU in the days 0 and 14 (*) could be seen ($p > 0.05$) showing that in the period the same value of viable lactobacilli was found. In the last day of storage, despite not having been raised by the statistics, 98% of the viable number of lactobacilli could be detected.

These results are sufficient to demonstrate not only the survival of the *L. casei* but their multiplication during the storage, showing that mango and yam show to be raw materials have

proved ideal for the proliferation of the microorganism. This is a great find to support the development of new products containing probiotics in their composition. (Saarela, 2011; Cadena et al., 2013)

The addition of supplements to the medium enrichment is a common practice. Sabanis et al (2009) supplemented rice in a soy-based beverage and obtained a great quantity of viable carbohydrate to fermentation. It's similar when we add YF into mango juice.

The excellent adaptation of *L. casei* still reflects its probiotic effect since during the whole storage period it presented the CFU count of $10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ value within the recommended to positive effects be observed in the host when there is an adequate intake (ANVISA, 2008; Abadia-Garcia et al., 2013).

FIGURA 1 ABOUT HERE

3.5 Resistance to simulated gastrointestinal tract in vitro by *L. casei*

The mean counts of *L. casei* obtained at times 0 and 28 days are shown in Figure 2. The average values were 8.76, 8.41, 6.70 and 5.43 LogUFC.mL⁻¹ for Control, Pepsin, Bile 2h and Bile 4h treatments on the preparation of beverages (D-0), respectively, and 8.67, 6.90, 6.65 and 5.40 LogUFC.mL⁻¹ for Control, Pepsin, Bile 2h and Bile 4h treatments on the 28th day of storage (D-28), respectively.

All analysis signed was different of the control group (#) ($p < 0.05$). However no significant difference in the count of microorganisms in the control group at time D-0 and D-28 was evidence.

The resistance to bile and pepsin was lower ($p < 0.05$) after 28 days of storage when compared to the day of the preparation of the beverage (o). This does not apply for exposure 2 hours to

bile. The longer exposure to bile led to less resistance ($p < 0,05$) of *L. casei* in both time D-0 and D-28.

The results show counts the order of 10^6 for all treatments with the exception to treatments with bile for 4 hours that present counts the order of 10^5 . It's a very good result once the viability of probiotics is an important factor to ensure their ability to promote health and wellness (FAO/WHO, 2002) and despite the acid and enzymatic attack the *L. casei* presented viable to exert it's benefic functions (Abadia-Garcia et al., 2013).

The results of the current study demonstrate that the *L. casei* was able to resist simulation of the gastrointestinal tract in vitro viability. These data corroborate the hypothesis that the mango supplemented with YF is a good alternative for adaptation of *L. casei* in probiotic products of plant origin.

FIGURE 2 ABOUT HERE

4. Conclusions

The development of probiotic beverages of plant origin is a promising area, but presents a major difficulty in the item acceptance. The results of this study provide a new perspective on fruit and substrate to be used for this purpose since the *L. casei* show a great resistance to the new medium both the storage time as its resistance to in vitro gastrointestinal tract simulations. Further studies still is required.

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Antunes A.E.C., Liserre A.M., Coelho A.L.A., Menezes C.R., Moreno I., Yotsuyanagi K., Azambuja N.C., 2013. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. *LWT - Food Science and Technology*. 54, 125-131.
- ANVISA. Agência Nacional de vigilância sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Julho/2008. http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm Accessed 22 fev 2014.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 2002. Official methods of analysis, 13^a ed. Washington.
- Cadena, R.S., Cruz, A.G., Netto, R.R., Castro, W.F., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., 2013. Sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. *Food Research International*, 54(2), 1670-1679.
- Costa M.G.M., Fonteles T.V., Jesus A.L.T., Rodrigues S., 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*. 139, 261–266.
- Espírito-Santo, A. P., Cartolano, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S. M., Gioielli, L. A., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M.N., 2012. Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acids profile and increase CLA content in yogurts. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 135–144.
- Espírito-Santo, A.P., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M.N., 2011. Influence of food matrices on probiotic viability e A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science & Technology* 22, 377-385.

FAO - Food and Agriculture Organization (2013) *Dioscorea cayenensis*. <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=5369>. Accessed 02 Jan 2014.

FAO/WHO, 2001. Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001. < http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/> Accessed 02 Jan 2014..

Fu L.S., Ko Y.H., Lin K.W., Hsu J.Y., Chu J.J., Chi C.S., 2009. Dioscorin protects tight junction protein expression in A549 human airway epithelium cells from dust mite damage. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 42(6):457-63.

Han C.H., Liu J.C., Fang S.U., Hou W.C., 2013. Antioxidant activities of the synthesized thiol-contained peptides derived from computer-aided pepsin hydrolysis of yam tuber storage protein, dioscorin. *Food Chemistry*. 138:923-30.

Itsaranuwat P., Al-Haddad K., Robinson R.K., 2003. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: A brief update. *International Journal of Dairy Technology*, 56 (4), 203–210.

Laudan R., 1997. *The Food of Paradise: Exploring Hawaii's Culinary Heritage*. University of Hawaii Press. Hawaii.

Levy R.B., Claro, R.M., Mondini L., Sichieri R., Monteiro, C.A., 2012. Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008-2009. *Revista de Saúde Pública*. 46(1), 6-15.

Liserre A. M., Franco B. D. G. M., Ré M. I., 2007. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*. 21, 1-16.

- Luckow T., Sheehan V., Fitzgerald G., Delahunty C., 2006). Exposure, health information and flavor-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite*. 47(3), 315-23.
- Luckow, T., Delahunty, C., 2004. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International*. 37, 805-814.
- Martins, E.M.F., Ramos A.M., Vanzela E.S.L., Stringheta P.C., Pinto C.L.O., Martins, J.M., 2013. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*. 51, 764–770.
- Mestres C., Dorthe S., Akissoé N., Hounhouigan J.D., 2004. Prediction of sensorial properties (color and taste) of amala, a paste from yam chips flour of West Africa, through flour biochemical properties. *Plant Food for Human Nutrition*. 59(3), 93-99.
- Pereira A.L.F., Maciel T.C., Rodrigues S., 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*. 44, 1276–1283.
- Saarela, M.H., 2011. Probiotic functional foods. *Functional Foods (Second edition)* 425-448
- Santos, F.F.; Almeida, M.A.; Brumano, L.P.; Pereira, M.S.; Stringheta, P.C.; Pinto, M.A.O., 2011. Elaboração do relatório técnico-científico para registro de leites fermentados com alegação de propriedade funcional. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. Nov/Dez, 383(66), 40-48.
- Shah, N. P., 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262–1277.
- Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F., 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.

Sheehan, V. M., Ross, P., Fitzgerald, G. F., 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.

Sheehan, V. M., Ross, P., Fitzgerald, G. F., 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. NEPA-UNICAMP.- Versão III. 2. ed. Campinas, SP, 2011.

Vlieg J.E.H., Veiga P, Zhang C.,Derrien M., Zhao L., 2011. Impact of microbial transformation of food on health—from fermented foods to fermentation in the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:211–219

Vodnar, D.C., Socaciu, C., 2014. Selenium enriched green tea increase stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in chitosan coated alginate microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 406-411.

Xiao J., Wang N.L., Sun B., Cai G.P., 2010. Estrogen receptor mediates the effects of pseudoprotodiocsin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 299(1), C128-38.

Yeh Y.H., Hsieh Y.L., Lee Y.T., 2013. Effects of yam peel extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31;61(30):7387-96.

Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D., 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 38, 73–75.

Yoon, K.Y.; Woodams, E.E.; Hang, Y.D., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 97, 1327-1430.

Tables

Table 1: Chemical analysis of yam flour (*Dioscorea cayennensis*)

Analysis	Yam Flour
	g.100 g ⁻¹
Moisture	3.31
Ash	4.60
Protein	8.57
Lipid	0.61
Carbohydrate	81.68
Fiber	10.7
Starch	74.5
Sugars - total and reducing	Tr*
Total energy (Kcal)	366.53
pH	5.85
Acidity	2.24

*Tr - traits

Table 2: Variation in pH during fermentation of mango and yam flour beverages

Time (hours)	Controls and beverages with different concentration of yam flour				
	C	C +	2.0%	3.5%	5.0%
0	3.80 ^{Aa}	3.90 ^{Ab}	4.00 ^{Ac}	4.10 ^{Ac}	4.20 ^{Ac}
24	3.50 ^{Aa}	3.69 ^{Ab}	3.81 ^{Ac}	3.93 ^{Ac}	4.04 ^{Ac}
48	3.47 ^{Ba}	3.64 ^{Bb}	3.78 ^{Bc}	3.88 ^{Bc}	3.87 ^{Bc}
72	3.40 ^{Ba}	3.60 ^{Bb}	3.70 ^{Bc}	3.67 ^{Bc}	3.57 ^{Bc}

C (juice only) and C+ (juice added *L. casei*) indicates the controls groups. 2.0%, 3.5% and 5.0% indicates the yam flour concentration in the beverages. A–B For each trial, means in the same line with different superscript capital letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test. a-c For each trial, means in the same column with different superscript lowercase letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test.

Table 3: Chemical composition of functional three mango and yam flour beverages

Analysis	Concentration of yam flour in the beverages		
	(g.100 g ⁻¹)		
	2.0%	3.5%	5.0%
Moisture	93.52	92.08	90.65
Ash	0.12	0.19	0.26
Protein	0.27	0.4	0.53
Lipid	0.31	0.32	0.33
Carbohydrate	5.78	7.01	8.23
Fiber	1.84	2.03	2.19
Total energy (Kcal)	26.99	32.52	38.01

Table 4: Sensory profile of the three mango and yam flour beverages

	2.0%	3.5%	5.0%
Color	7.44±1.64 ^{Aa}	7.34±1.75 ^{Aa}	7.41±1.59 ^{Aa}
Appearance	7.14±1.66 ^{Ab}	7.05±1.71 ^{Ab}	6.85±1.95 ^{Ab}
Aroma	3.49±2.22 ^{Ac}	3.53±2.06 ^{Ac}	3.61±2.16 ^{Ac}
Taste	3.42±2.12 ^{Ac}	3.44±2.21 ^{Ac}	3.05±2.14 ^{Ac}
Overall liking	3.98±2.06 ^{Ac}	3.88±2.12 ^{Ac}	3.54±2.18 ^{Ac}

2.0%, 3.5% and 5.0% indicates the yam flour concentration in the beverages. The results are showing as means $\pm$ standard deviations. A For each trial, means in the same line with different superscript capital letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test. a - c For each trial, means in the same column with different superscript lowercase letters differ significantly ($p < 0.05$) between the mean values according to the t test.

Figures

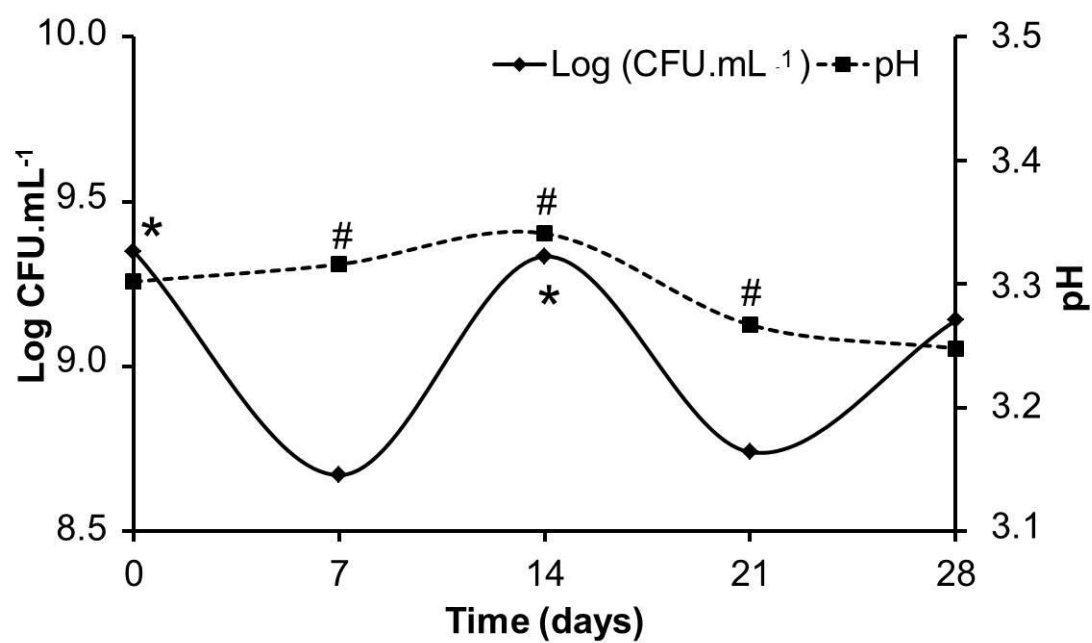


Figure 1: Variation in pH and count of CFU (LogUFC.mL⁻¹) during shelf life.

Asterisks (*) and the symbol # indicated no significant difference between the values in pH and CFU axis, respectively.

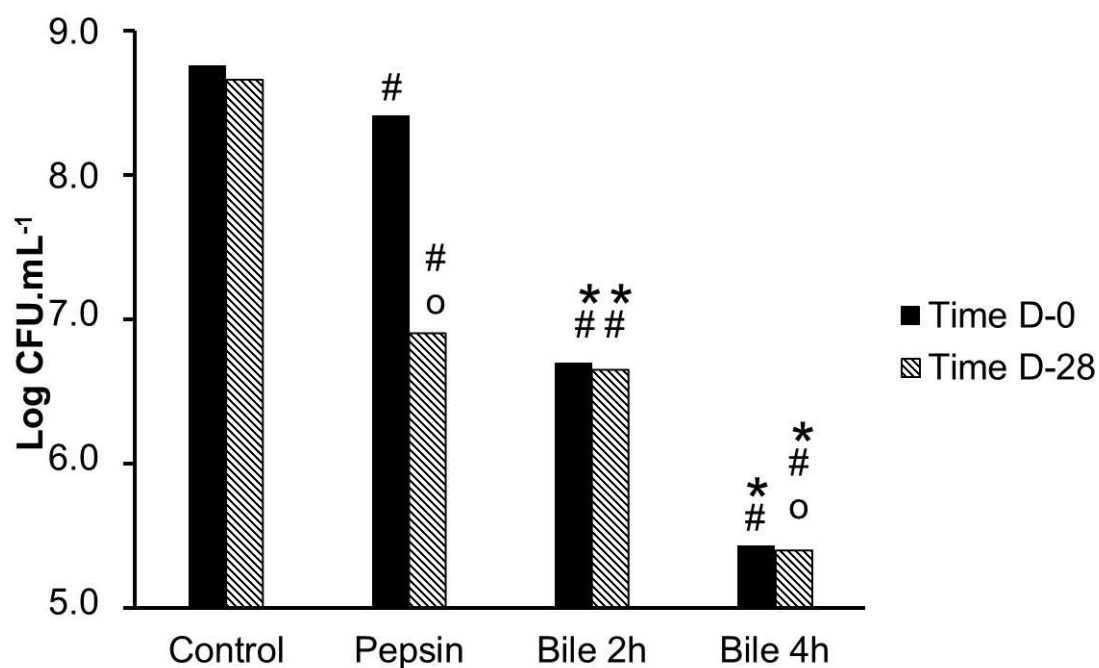


Figure 2: Resistance of *L. casei* to in vitro simulated gastrointestinal tract.

Count of CFU is showed in LogUFC.mL⁻¹ on the preparation of the beverages (D-0) and in the 28th day (D-28) of storage. The symbol # indicated that samples differs significantly of control. The symbol (o) indicated that samples differs significantly with time ($p < 0.05$). and asterisks (*) indicated that samples differs significantly themselves in the same time.

Considerações finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos resultados desta tese leva às seguintes conclusões:

- O inhame é uma matéria prima com excelentes características nutricionais, sendo viável sua conversão em farinha para fins de adição alimentar;
- O uso dos sucos de abacaxi, manga e maracujá adicionados da farinha de inhame se mostraram uma boa alternativa para a viabilização do *L. casei* em bebidas probióticas de origem vegetal;
- É importante a realização de novos estudos para melhorar a aceitação das bebidas

Como perspectiva de continuidade desta linha de pesquisa, sugere-se a realização de novos experimentos que visem subsidiar a otimização das bebidas obtidas neste estudo, tanto sob o aspecto financeiro como sensorial, tornando-as passíveis de industrialização.

Referências

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 1414. Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas.** Rio de Janeiro, 1998.

ANVISA. Agência Nacional de vigilância sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.** Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm Acesso em: 19 de abril de 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**, 13^a ed. Washington, 2002.

ATZINGEN, M.C.B.C.V.; SILVA, M.E.M.P. **Inhame na formulação de pão sem glúten / Yam starch in gluten - free Bread.** Nutrire.,v. 22 p. 33-48, dez, 2001.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. **Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.19, n.3, p.363-366, 1999.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm Acesso em 19 de abril de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa Nº 12, de 4 de setembro de 2003. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade**

e **Qualidade Gerais para Suco Tropical.** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultaLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Acesso em: 19 de abril de 2013.

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

BVS – Biblioteca virtual em saúde. **Alimentos funcionais.** Atualizado em 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html Acesso em: 14 fev 2014

CALDER, P.C.; KEW, S. **The immune system: a target for functional foods?** British Journal of Nutrition. v.28, suppl. 1, p.165-176, 2002.

CAMPOS, D.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; CHIRINOS, R.; AGUILAR-GALVEZ, A.; NORATTO, G.; PEDRESCHI, R. **Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity.** Food Chem. v. 135, n.3, p. 1592-9, 2012.

CÉSPEDES M, CÁRDENAS P, STAFFOLANI M, CIAPPINI MC, VINDEROLA G. **Performance in nondairy drinks of probiotic *L. casei* strains usually employed in dairy products.** J Food Sci., v. 78, n.5, p.756-62, 2013.

CFAM. **Image of the month.** December 2012. Disponível em <<http://www.reading.ac.uk/cfam/Imageofthemonth/Imageofthemonth2012/December.aspx>> acesso em 10 jun 2013.

DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C.; DEGIVRY, M.C.; BOULEY, C.; SZYLIT, O. **The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats.** J Nutr., v. 127, n. 11, p. 2260-6, 1997.

EMBRAPA. **A cultura do maracujá**. Ed. Textonovo. 76p. 1994.

EMBRAPA. **Abacaxi**. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas-abacaxi.php&menu=2 acesso em: 13 jul. 2013(a).

EMBRAPA. **Informe técnico: Características das cultivares de abacaxizeiros cultivadas no Estado de Rondônia**. Porto Velho, 2009. Disponível em < <http://www.exporbrasil.com/search/web/?cx=partner-pub-5444919325954669:5997312639&cof=FORID:10&ie=UTF-8&q=Informe+t%c3%a9cnico%3a+Caracter%c3%adsticas+das+cultivares+de+abacaxizeiros+cultivadas+no+Estado+de+Rond%c3%b4nia&s=0&a=3> > acesso em: 13 fev. 2014.

EMBRAPA. **Manga**. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas-manga.php&menu=2> acesso em: 13 jul 2013(b).

EMBRAPA. **Maracujá**. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas-maracuja.php&menu=2 acesso em: 13 jul 2013(c).

FAO. United Nations food and agriculture. **ECOCROP**. *Dioscorea cayenensis*. Disponível em: < <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=5369> > acesso em: 12 jun 2013

FAO/WHO. Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001. Disponível em: < http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/ > Acesso em 02 fev 2014.

FARNWORTH, E.R. **The evidence to support health claims for probiotics**. Journal of Nutrition, v. 138, p. 1250S-1254S, 2008.

FORESTIER, C.; CHAMPS, C.; VATOUX, C.; JOLY, B. **Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties**. Res Microbiol. V. 152, n. 2, p.167-173, 2001.

FRANCO, M. R. B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; LANCAS, F. M. **Compostos Voláteis de Três Cultivares de Manga** (*Mangifera indica* L.). Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.24, n.2, p. 165-169, 2004.

FULLER, R. **Probiotics in man and animals**. J. Appl. Bacteriol., v. 66, p.365-378, 1989

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics**. J Nutr. v.125, n. 6, p. 1401-12, 1995.

GUANDALINI, S. **Probiotics for prevention and treatment of diarrhea**. J Clin Gastroenterol. v. 45, p. S149-53, 2011

HARDY, H.; HARRIS, J.; LYON, E.; BEAL, J.; FOEY, A.D. **Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology**. Nutrients.,. 29(5), n. 6, p.1869-912, 2013.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. **Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition**. Am J Clin Nutr., v. 73, n. 2, p. 365S-373S, 2001.

HOSSEIN, N.M.; STENZEL, D.J.; BRITZ, M.L. **Effect of growth at low pH on the cell surface properties of a typical strain of *Lactobacillus casei* group**. Iran. J. Microbiol., v. 2, n. 3, p.144-151, 2010

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 1ª ed. Imprensa. São Paulo, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística . **Produção Agrícola Municipal – PAM**. Banco de Dados SIDRA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 25 out. 2012

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Culturas temporárias e permanentes 2011**. Prod. agric. munic., Rio de Janeiro, v. 38, p.1-97, 2011

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Vamos conhecer o Brasil - relevo e clima.** Disponível em: <<http://7a12.ibge.gov.br/vamos-conhecer-o-brasil/nosso-territorio/relevo-e-clima>> acesso em 19 fev 2014.

JHENG, Y.J.; TSAI, W.Y.; CHEN, K.H.; LIN, K.W.; CHYAN, C.L.; YANG, C.C.; LIN, K.C. **Recombinant dioscorins of the yam storage protein expressed in *Escherichia coli* exhibit antioxidant and immunomodulatory activities.** Protein Expr Purif., v. 85, n. 1, p. 77-85, set, 2012.

KANMANI P, SATISH KUMAR R, YUVARAJ N, PAARI KA, PATTUKUMAR V, ARUL V. **Probiotics and its functionally valuable products-a review.** Crit Rev Food Sci Nutr., v. 53, n. 6, p. 641-58, 2013.

KRAMMER, H.J.; VON SEGGERN, H.; SCHAUMBURG, J.; NEUMER, F. **Effect of *Lactobacillus casei* Shirota on colonic transit time in patients with chronic constipation.** Coloproctology., v. 33 p. 109-113, 2011.

KUMAR, A.; KUMAR, M.; GHOSH, M.; GANGULI, A. **Modeling in vitro cholesterol reduction in relation to growth of probiotic *Lactobacillus casei*.** Microbiol Immunol., v. 57, n. 2, p. 100-10, fev, 2013.

LECERF, M.J. **Prébiotiques, flore intestinale, inflammation, obésité.** Phytothérapie. v., 9, p. 106-112, 2011.

LEE, J.; BANG, J.; WOO, H.J. **Immunomodulatory and anti-allergic effects of orally administered *Lactobacillus* species in ovalbumin-sensitized mice.** J Microbiol Biotechnol., v. 23, n. 5, p. 724-30, mai, 2013.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. Handbook of probiotics. New York, Chichester. Willey, 1999. 211p.

LEONEL, M.; MISCHAN, M.M.; PINHO, S.Z.; IATAURO, R.A.; DUARTE-FILHO, J. **Efeitos de parâmetros de extrusão nas propriedades físicas de produtos expandidos de**

inhame. Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campinas, v. 26, n. 2, p. 459-464, Abr/Jun, 2006.

LIMA, J.A. **Potencialidades de industrialização do Inhame e do Taro no Brasil.** In: Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do taro. João Pessoa. Anais. EMEPA-PB, p.275-303, 2002.

LISERRE, A. M.; FRANCO, B. D. G. M; RÉ, M. I. **Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions.** Food Biotechnology, v. 21, p. 1-16, 2007.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. **Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients.** Food Research International, v. 37, p. 805-814, 2004.

LUCKOW, T.; SHEEHAN, V.; FITZGERALD, G.; DELAHUNTY, C. **Exposure, health information and flavor-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice.** Appetite. v. 47, p. 315-323, 2006.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003. Regulamento técnico geral para fixação de identificação e qualidade gerais para suco tropical.** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultaLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831> acesso em: 18 dez 2013.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. **Technological challenges for future probiotic foods.** International Dairy Journal, v.12, p. 173-182, 2002.

MAZLYN, M.M.; NAGARAJAH, L.H., FATIMAH, A., NORIMAH, A.K., GOH, K.L. **Effects of a probiotic fermented milk on functional constipation: A randomized, double-blind, placebo-controlled study.** J Gastroenterol Hepatol. v. 28, n. 7, p. 1141-7, jul, 2013.

MCCLEARY, B.V.; MURPHY, A.; MUGFORD, D.C. **Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study.** J. AOAC Int. v.82 n. 2, p. 356-364, Mar-Apr: 2000.

MEILGAARD, M. ; CIVILLE, G. ; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques.** London: CRC. PRESS, Inc., 2. 281, 1987.

MEIRA, S.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V.; LOPES, F.C.; BRANDELLI, A. **Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese.** J Dairy Res. V. 79, n. 1, p. 119-27, 2012

MIRNEJAD, R.; VAHDATI, A.R.; RASHIDIANI, J.; ERFANI, M.; PIRANFAR, V. **The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro.** Iran Red. Crescent. Med. J., v. 15, n. 2, p. 122-6, fev, 2013.

ORTOLAN, F.; HECKTHEUER, L.H.; MIRANDA, M.Z. Efeito do armazenamento à baixa temperatura (−4 °C) na cor e no teor de acidez da farinha de trigo. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.30, n.1, 2010

OPARA, L.U. **Yams: Post-Harvest Operation.** AGST/FAO. New Zealand. 22p. Ago, 2003.
PARKER, R. B. **Probiotics, the other half of the antibiotic story.** Anim. Nutr. Health., v. 29, p. 4-8, 1974

PIRES, M.M.; MATA, H.T.C. **Uma abordagem econômica e mercadológica para a cultura do maracujá no Brasil.** In LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. Maracujá: Produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa mandioca e fruticultura, 2004. 396p.

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. **Trends in non-dairy probiotics beverages.** Food Res. Int., v.41, n.2. p.111-123, 2008.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops: monocotyledons.** New York: J. Wiley & Sons, 1975.

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

RENUKA, B.; KULKARNI, P.; PRAPULLA, S.G. **Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: effect on the quality characteristics.** LWT – Food Science and Technology, v. 42, n.5, p. 1031-1033, 2008.

ROBERFROID, M. **Prebiotics: The Concept Revisited.** J. Nutr. v. 137, p. 830S–837S, 2007.

ROBERFROID, M.B. **Functional foods concept and its application to prebiotics.** Digest and Liver Disease, v.34, suppl. 2, p. S105-110, 2002

ROGÉRIO, M.C.P.; BORGES, I.; NEIVA, J.N.M.; RODRIGUEZ, N.M.; PIMENTEL, J.C.M.; MARTINS, G.A.; RIBEIRO, T. P.; COSTA, J.B.; SANTOS, S.F.; CARVALHO, F.C. **Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananas comosus* L.) em dietas para ovinos. 1. Consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 773-781. Jun 2007.

SAAD, S.M.I. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** Rev. Bras. Cienc. Farm., São Paulo , v. 42, n. 1, mar. 2006

SAAD, S.M.I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E.M. **Benefícios à saúde dos Probióticos e Prebióticos.** In: Saad, S.M.I; Cruz, A.G; FARIA, J.A.F. Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo, Varela, 2011.

SABATER-MOLINA, M.; LARQUÉ, E.; TORRELLA, F.; ZAMORA, S. **Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health.** J Physiol Biochem. v.65, n.3, p.315-28, 2009.

SANDERS, M.E. **Probiotics: considerations for human health.** Nutrition Reviews, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003

SANTOS, E.S. **Inhame (Dioscorea sp.): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996.

SANTOS, F.F.; ALMEIDA, M.A.; BRUMANO, L.P.; PEREIRA, M.S.; STRINGHETA, P.C.; PINTO, M.A.O. **Elaboração do relatório técnico-científico para registro de leites fermentados com alegação de propriedade funcional**. Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”, v. 66, n. 383, p. 40-48, 2011

SCARPELLINI, E.; CAMPANALE, M.; LEONE, D.; PURCHIARONI, F.; VITALE, G.; LAURITANO, E.C.; GASBARRINI, A. **Gut microbiota and obesity**. Intern Emerg Med. v. 5, Suppl. 1, p. S53-S56, 2010.

SCHMIDT, F.L.; PEREIRA, K.S. **O potencial dos probióticos e prebióticos em bebidas de origem vegetal**. In: Saad, S.M.I; Cruz, A.G; FARIA, J.A.F. Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo, Varela, 2011.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. **Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition**. Am J Clin Nutr., v. 73, n. 2 Suppl, p. 361S-364S, 2001.

SECEX – Secretaria do Comércio Exterior. **Comércio exterior**. Disponível em <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/index.php?area=5>> Acesso em 18 fev 2014

SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. **Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices**. Innovative Food Science and Emerging Technologies. v. 8, p. 279-284, 2007.

SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. **Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices**. Innovative Food Science and Emerging Technologies. v. 8, p. 279-284, 2007.

SHIBY, V.K.; MISHRA, H.N. **Fermented milks and milk products as functional foods--a review**. Crit Rev Food Sci Nutr., v. 53, n. 5, p. 482-96, 2013.

SHUKLA, G.; KAUR, H.; SHARMA, L. **Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis.** Parasitol Res. v. 112, n. 6, p. 2143-9, jun, 2013.

SOCCOL, C.R.; PRADO, F.C.; PARADA, J.L. **Technological process to produce a coconut fermented beverage with probiotic properties.** BR patent PI0703244-7, 2007.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SPIER, M.R. **The Potential of Probiotics: A Review.** Food Technol. Biotechnol., v. 48, n.4, p. 413-34, 2010

SORENSEN, D.; BOGUE, J. **A conjoint-based approach to concept optimization: probiotic beverages.** British Food Journal, v. 107, n.11, p. 870-83, 2005

SOUZA, J.S.; CARDOSO, C.E.L.; LIMA, A.A.; COELHO, E.F. **Aspectos socioeconômicos.** In LIMA, A.A. (org). Frutas do Brasil – Maracujá – Produção – Aspectos técnicos. Brasília. Embrapa informação tecnológica, 2002. 104p.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** NEPA-UNICAMP.- Versão III. 2. ed. Campinas, SP, 2011.

THÉ P.M.P. **Quais as propriedades medicinais do abacaxi?** Revista Ciência Hoje. Ceará, v.39, n.229. p.4, jan/fev. 2007.

URALA, N.; LAHTEENMAKI, L. **Consumers changing attitudes towards functional foods.** Food Quality and Preference, v. 18, p. 1-12, 2007

VANDENPLAS, Y.; BENNINGA, Y. **Probiotics and Functional Gastrointestinal Disorders in Children.** Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. v. 48 p. S107-S109, 2009.

VENTURA, I.; FONTOURA, P.S.G. **Obtenção e caracterização da farinha de inhame *Colocasia esculenta* (L.).** Schott. B. Ceppa, Curitiba, v.12, n.1, p 25-32, jan-jun, 1994.

VERMA, A.; SHUKLA, G. **Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* suppresses DMH-induced procarcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats.** Nutr Cancer., v. 65, n. 1, p. 84-91, 2013.

VLIEG, J.E.T.H.; HUGENHOLTZ, J. **Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavor and health benefits.** International Dairy Journal, v.17, p. 1290-97, 2007

WALKER, A.W.; LAWLEY, T.D. **Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis.** Pharmacological Research., v. 69, p. 75– 86, 2013.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. **Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria.** Bioresource Technology. v. 97, p. 1327-1430, 2006.

ZÁRATE, N.A.H.; VIEIRA, M.C. **Composição nutritiva de rizomas de clones de inhame cultivados em Dourados-MS.** Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiania, v. 34, n. 1, p. 61-63, jul. 2006

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. **An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies.** Int. Dairy J., Amsterdam, v.8, p.473-479, 1998.

ZOPPI, G.; CINQUETTI, M.; BENINI, A.; BONAMINI, E.; MINELLI, E.B. **Modulation Of The Intestinal Ecosystem By Probiotics And Lactulose In Children During Treatment With Ceftriaxone.** Current Therapeutic Research Clinical and Experimental. v. 62, n. 5, Maio, 2001.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice 01: Termo de consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Análise do potencial prebiótico do inhame (*Dioscorea cayennensis*) e sua utilização na formulação de bioproduto simbiótico à base de frutas tropicais e *Lactobacillus casei*.”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Cinthia Karla Rodrigues do Monte Guedes (Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição -Rua Professor Nelson Chaves, S/N - Cidade Universitária - 50670-901 - Recife, PE – Brasil; telefone: (81)92116846 (inclusive ligações a cobrar); e-mail: ckrvasconcelos@gmail.com e está sob a orientação de Tânia Lúcia Montenegro Stamford (81)21268473 R-8463; e-mail: tlmstamford@yahoo.com.br

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Natureza e objetivos do estudo

O objetivo específico deste estudo é determinar a capacidade prebiótica do Inhame (*Dioscorea cayennensis*) e utilizá-lo para a elaboração de uma bebida simbiótica à base de frutas tropicais e fermentada com *Lactobacillus casei* (DN-114 001). Você está sendo convidado a participar exatamente pela necessidade de verificar a aceitação das bebidas elaboradas.

Procedimentos do estudo

Sua participação consiste em provar, uma única vez, as diferentes bebidas elaboradas e indicar sua aceitação e preferência. Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

Riscos e benefícios

A pesquisa apresenta baixo risco, inerente apenas ao procedimento de prova das bebidas, que poderá apresentar sabor não usual, devido ao processo de fermentação. Não há relatos na literatura que limitem a prova deste tipo de bebida, uma vez que todos os ingredientes usados para sua elaboração são bastante disseminados na população Brasileira. Entretanto, caso apresente qualquer alergia ou intolerância a qualquer componente da bebida, você será excluído do teste.

Sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre a aceitação de bebidas fermentadas, que são apontadas hoje como uma boa fonte alimentar para o consumo de prebióticos e probióticos que possuem reconhecidos efeitos benéficos para o funcionamento intestinal dos indivíduos, além de reconhecidas propriedades terapêuticas e/ou profiláticas.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo

Sua participação é voluntária. Você não terá nenhum prejuízo se não quiser participar. Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com o pesquisador responsável. Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade

Seus dados serão manuseados somente pelos pesquisadores e não será permitido o acesso a outras pessoas. O material com as suas informações ficará guardado sob a responsabilidade do pesquisador responsável com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas, sob responsabilidade do pesquisador principal, no endereço acima informado pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Cinthia Karla Rodrigues do Monte Guedes

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Análise do potencial prebiótico do inhame (*Dioscorea cayennensis*) e sua utilização na formulação de bioproduto simbiótico à base de frutas tropicais e *Lactobacillus casei*.” como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

_____, ____ de _____ de _____

Participante

Nome*

Assinatura

Nome*

Assinatura

* Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Apêndice 2 - Ficha para análises sensoriais

NOME: _____ SEXO: M() F()

E-mail: _____ IDADE: _____ anos

Você está recebendo três amostras de bebidas. Deguste cuidadosamente cada uma e avalie cada atributo de acordo com a seguinte escala hedônica:

- 9- Gostei muitíssimo
- 8- Gostei muito
- 7- Gostei regularmente
- 6- Gostei ligeiramente
- 5- Indiferente
- 4- Desgostei ligeiramente
- 3- Desgostei regularmente
- 2- Desgostei muito
- 1- Desgostei muitíssimo

ATRIBUTO	AMOSTRA		
COR			
APARÊNCIA			
ODOR			
SABOR			
QUALIDADE GLOBAL			

Indique sua intensão de compra para cada uma das bebidas

5- Certamente compraria

4- Provavelmente compraria

3- Talvez compraria/ Talvez não compraria

2- Provavelmente não compraria

1- Certamente não compraria

AMOSTRA		

Ordene as bebidas de acordo com sua preferência

Prefiro mais

Prefiro menos

Anexos

Anexos

Anexo 1 – Comprovante de submissão do artigo de revisão

	vagner.neujahr@gmail.com por manuscriptcentral.com
---	--

para mim, ckrodrigues, mim, ckrodrigues, thayzastamford, tlmstamford	18 de mar
---	-----------

18-Mar-2014

Dear Mrs. Monte-Guedes:

Your manuscript entitled "INHAME (Dioscorea sp.): ALIMENTO FUNCIONAL EM POTENCIAL" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Ciência Rural.

Your manuscript ID is CR-2014-0410.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Ciência Rural.

Sincerely,
 Ciência Rural Editorial Office

Anexo 2 - Parecer consubstanciado do CEP

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	--	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO INHAME (*Dioscorea cayennensis*) E SUA UTILIZAÇÃO NA FORMULAÇÃO DE BIOPRODUTO SIMBIÓTICO À BASE DE FRUTAS TROPICAIS E *Lactobacillus casei*.

Pesquisador: Cinthia Karla Rodrigues do Monte Guedes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15312113.2.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 472.390

Data da Relatoria: 02/12/2013

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

Recomendação;

a) Indicar de forma adequada os critérios para abordagem dos sujeitos da pesquisa e o local;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com recomendação.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS			
Bairro: Cidade Universitária		CEP: 50.740-800	
UF: PE	Município: RECIFE		
Telefone: (81)2126-8588	Fax: (81)2126-8588	E-mail: cepcos@ufpe.br	

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 472.390

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 28 de Novembro de 2013

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

Anexo 3 – Comprovante de submissão do artigo original 1

	Food Research International fri@uoguelph.ca eesmail.elsevier.com	16 de abr (Há 5 dias)
para mim, ckrodrigues		
Dear Prof. Cinthia K.R. Monte-Guedes,		
Your submission entitled "Functional beverage of Passion fruit (<i>Passiflora edulis</i> Sims) and Yam (<i>Dioscorea caynnensis</i>) fermented with <i>Lactobacillus casei</i> " has been received by Food Research International		
You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is http://ees.elsevier.com/foodres/ .		
Your username is: ckrvasconcelos@gmail.com If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/foodres/automail_query.asp		
Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.		
Thank you for submitting your work to this journal.		
Kind regards,		
Elsevier Editorial System Food Research International		
< b>Important information to authors concerning the manuscript processing at Food Research International and correspondence with the Editorial Office		
All papers submitted to FRI undergo a process of pre-review evaluation which will determine whether they are sent for external review (see Guide for Authors).		
FRI submissions have increased by over 40% over the past three years, and while editors try to process them rapidly as possible, the pre-review evaluation of many papers cannot be completed in a short time. When a paper is marked "With Editor" in EES, the pre-evaluation review is being completed.		
Papers that are accepted for external review are sent to peer reviewers. Finding reviewers who are both specialized in the same field as the manuscript topic and who are available to review can be a long and time-consuming process. Papers marked "Under Review" have not been forgotten, but frequently it takes multiple attempts to find two peer reviewers who will actually review the submission.		
Authors should only send correspondence to the journal about technical issues - e.g. password difficulties, missing data, adding another author, or some other item that was forgotten or overlooked when the paper was uploaded into EES. Enquiries concerning the status of papers, given the very small staff at the FRI Editorial Office, and its part-time operation, will delay the processing of manuscripts; there is no guarantee that such enquiries will be answered.		
For further assistance, please visit our customer support site at http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923 . Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.		