



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

ANAMARES FERREIRA GOMES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE YACON (*SMALLANTHUS
SONCHIFOLIUS*), KEFIR E YACON ASSOCIADO COM KEFIR SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL E ÓSSEA EM RATOS**

ALEGRE – ES
FEVEREIRO - 2021

ANAMARES FERREIRA GOMES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE YACON (*SMALLANTHUS
SONCHIFOLIUS*), KEFIR E YACON ASSOCIADO COM KEFIR SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL E ÓSSEA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa

Coorientadoras: Profa.Dra. Mirelle Lomar Viana

Profa. Dra. Maria das Graças Vaz Tostes

ALEGRE-ES

FEVEREIRO – 2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F383a Ferreira Gomes, Anamares, 1992-
Avaliação dos efeitos do consumo de yacon (*smallanthus
sonchifolius*), kefir e yacon associado com kefir sobre a saúde
intestinal e óssea em ratos / Anamares Ferreira Gomes. - 2020.
62 f. : il.

Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa.

Coorientadores: Mirelle Lomar Viana, Maria das Graças Vaz
Tostes.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias.

1. saúde óssea. 2. saúde intestinal. 3. probióticos. 4. prebióticos.
5. kefir. I. Brunoro Costa, Neuza Maria. II. Lomar Viana,
Mirelle. III. Vaz Tostes, Maria das Graças. IV. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias. V. Título.

CDU: 664

ANAMARES FERREIRA GOMES

**'AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE YACON
(SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS), KEFIR E YACON
ASSOCIADO COM KEFIR SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL E ÓSSEA EM RATOS'**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do
Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 27 de novembro de 2020.

Neuzauslofa

Prof.^a Dr.^a Neuz Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Orientadora

AGV

Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinador Interno

Mirelle Lomar Viana

Prof.^a Dr.^a Mirelle Lomar Viana
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES
Examinadora Externa

Mariana Grancieri

Dr.^a Mariana Grancieri
Centro Universitário São Camilo
Examinadora Externa

AGRADECIMENTOS

Ao final deste ciclo, meu coração está repleto de gratidão e alegria, quero agradecer primeiramente á Deus, por sua maravilhosa Graça e amor em me abençoar na realização deste sonho, minha força e meu refúgio, presença constante em minha vida.

Á minha família, meus pais José e Dilamar, por sempre se esforçarem para me ajudar a realizar meus sonhos e acreditarem sempre em mim, me dando apoio incondicional em todas as minhas escolhas e minha irmã Ana Carolina, pela apoio torcida, amizade e orações, aos meus queridos primos, Rômulo, Bruno, Patrícia, Eliane e Welida pela torcida e também os momentos de descontração em Ubá e também aos meus queridos Pedro e Kelly por sua torcida, amor e apoio constantes. Aos meus avós Neuza, João e Plínio por todas as orações e apoio. Aos meus muitos e queridos tios e tias. toda a minha família a minha eterna gratidão!

Agradeço também a minha orientadora professora Dra. Neuza por sua generosidade, carinho e paciência para comigo em todas as fases dessa pesquisa, sobretudo por ter acreditado e confiado em mim para a realização desse projeto.

Às minhas coorientadoras, Profa. Dra. Mirelle Lomar Viana, por toda a presteza e ajuda na realização das análises de IgA e procedimento de gavagem nos animais, sempre de maneira calma e gentil e a Profa. Maria das Graças Vaz Tostes por toda a ajuda e disposição em sanar minhas dúvidas, sobretudo na realização da análise de fibras.

Expresso a minha gratidão também aos meus amigos antigos e os conquistados em Alegre, prova de todo o cuidado e amor do altíssimo para comigo. Em especial, aos colegas da turma do PCTA 2018/02, Bárbara, Ionara, Laudiane, Magno e Emanuely por toda a amizade e cumplicidade, sempre me lembrarei de todos vocês com muito carinho e amor. As amigas Gabriela e Ângela amigas e irmãs na fé que Alegre me deu. Aos queridos Maurício e Germano pela amizade. E as amigas 'de sempre' de Ubá, Julianna, Michelle, Kamila, Jéssica e todos os outros que fizeram dos meus finais de semana em casa, sempre mais agradáveis;

Á todos os funcionários do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos queridos Eduardo e Anderson do laboratório de Nutrição Experimental e

Fisiologia Humana, por toda ajuda, convivência diária harmoniosa, presteza e todos os momentos de descontração, a minha total gratidão á vocês

Agradeço á Keila e Caroline por toda a ajuda ao decorrer de todo o experimento e por sempre serem tão generosas e prestativas em todos os momentos, muito obrigada meninas!

A todas as pessoas que contribuíram para a conclusão deste trabalho, me ajudando sempre que precisei com muita prestatividade e paciência, Thaisa Veridiano, Alexandre Vinco, Yasmim, Viviane Tavares, Sara Oliveira, Raphael Maximino professoras Patrícia Bernardes, Patrícia Fontes, Daniela Silva, professor Joel Carneiro e á todos os demais que mesmo não citados nominalmente contribuíram de alguma forma para a concretização e interpretação das análises;

Aos membros da banca, Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa, Profa. Dra. Mirelle Lomar Viana, Dra. Mariana Grancieri.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa;

Por fim, sempre serei grata á todos e me recordarei desse período com muito carinho e afeto. Sem cada um de vocês o cumprimento dessa missão a mim confiada não seria possível, muito obrigada! ENFIM MESTRA!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AAS - espectrometria de absorção atômica

ad libitum - do latim, significa 'à vontade'

AGCC - ácido graxo de cadeia curta

AIN - *American Institute Of Nutrition*

AIN-93 M – fórmula purificada para a nutrição de roedores experimentais adultos

ANOVA – análise de variância

BAL - Bactérias do Acido Láctico

Ca - cálcio

CEA – coeficiente de eficiência alimentar

CTx- C-terminal do colágeno tipo-I

DACNT- agravos crônicos não transmissíveis

DMO – densidade mineral óssea

ELISA - do inglês "*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*"

FOS - frutooligosacarídeos

GOS - Galactooligosacarídeo

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IL - Interleucina

ISAPP- Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos

NTx- N-telopeptídeo do colágeno tipo-I.

OVX - Ovarioectomizada

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PTH - hormônio da paratireoide

ROR γ t - do inglês, Factor Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gamma t. Fator de transcrição das células Th17

sIgA - imunoglobulina A secretória

Sr - estrôncio

UHT- ultra high temperature

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Consumo de yacon e os principais benefícios promotores de saúde	19
Figura 2- Farinha de yacon embaladas em embalagens do tipo <i>Stand Up Pouch</i>	27
Figura 3- Fermentação do kefir em recipiente de vidro.	31
Figura 4- pH intraluminal observado dos animais.	40
Figura 5- Concentração de sIgA (ng/mL) dos animais nos grupos experimentais. ...	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo de tratamentos prebióticos para avaliar sua eficácia na alteração da absorção de minerais, refletindo na saúde óssea.	21
Tabela 2- Resumo de tratamentos probióticos com o objetivo de melhorar a saúde óssea.....	25
Tabela 3- Composição das dietas experimentais (g/kg).....	34
Tabela 4- Caracterização físico-química da farinha de yacon usada no preparo das dietas.....	35
Tabela 5- Alteração ponderal e consumo alimentar dos animais durante o experimento.....	39
Tabela 6- Excreção fecal (g), Absorção aparente (%) e balanço mineral (mg/dia), dos animais	41
Tabela 7- Excreção urinária de lactulose e manitol dos animais na última semana do experimento	43
Tabela 8- Concentração de biomarcadores ósseos (ng/mL)	45

RESUMO

GOMES, ANAMARES FERREIRA. Avaliação dos efeitos do consumo de yacon (*smallanthus sonchifolius*), kefir e yacon associado com kefir sobre a saúde intestinal e óssea em ratos. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa. Coorientadoras: Profa. Dra Mirelle Lomar Viana, Profa. Dra. Maria das Graças Vaz Tostes.

O kefir é um alimento funcional que apresenta uma grande fonte de probióticos naturais que conferem benefícios à saúde intestinal do hospedeiro. A yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa originária da região dos Andes, rica em frutooligossacarídeos (FOS), os quais possuem propriedades prebióticas, aumentam a absorção de vários minerais, dentre eles o cálcio além de proporcionar aumento da mineralização óssea. Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades prebióticas do yacon e probióticas do kefir e da associação entre eles na saúde intestinal e óssea de ratos. Ratos Wistar adultos foram divididos em 4 grupos: Controle (C), Kefir (K), Yacon (Y) e Yacon + Kefir (YK), que receberam suas dietas por 42 dias. Animais do grupo C receberam a dieta padrão AIN-93 M e 1mL /dia de leite UHT integral; o grupo K recebeu a mesma dieta e 1mL/dia da bebida fermentada de kefir contendo 10^8 UFC/mL; o grupo Y recebeu farinha de yacon em quantidades suficientes para fornecer 5% de FOS e 1 mL/dia de leite UHT integral e o grupo YK recebeu a mesma dieta de farinha de yacon e 1 mL/dia da bebida de kefir. Fezes e urina foram coletados por 5 dias para determinação da absorção aparente e o balanço de cálcio. Na última semana, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas para a coleta da urina de 24h para análise da permeabilidade intestinal. Para isso, receberam via gavagem, 1 mL de uma solução contendo 200 mg de lactulose e 100 mg de manitol. Amostra sanguínea foi coletada para análise dos biomarcadores séricos de formação e reabsorção óssea: Osteocalcina, N-telopeptídeos do colágeno tipo-I (NTx) e C-telopeptídeo do colágeno tipo I (Ctx). O conteúdo do intestino grosso foi coletado para análise do pH intraluminal e imunoglobulina A secretória (sIgA). A administração do kefir e da yacon, isoladamente, favoreceram a integridade da mucosa intestinal, diminuindo a permeabilidade

intestinal, através da diminuição da concentração de lactulose e manitol na urina, o simbiótico reduziu a excreção de manitol mas não de lactulose. Tanto o kefir quanto o yacon e o simbiótico foram capazes de reduzir o pH intestinal, porém apenas o kefir e o simbiótico foram eficazes em aumentar os níveis de sIgA. Não houve diferença na absorção aparente de cálcio ($p>0,05$) entre os grupos, contudo o simbiótico foi eficiente no balanço de cálcio e o kefir demonstrou ser efetivo em evitar a reabsorção óssea, reduzindo os níveis de marcadores osteoclásticos, Ctx e Ntx. A yacon foi eficaz na formação óssea, aumentando os níveis de osteocalcina. A junção da yacon com kefir não apresentou o resultado simbiótico esperado, uma vez que não favoreceu a saúde óssea e intestinal dos animais de maneira expressiva, ou seja, os valores obtidos para o simbiótico foram intermediários entre os efeitos positivos da yacon e do kefir isoladamente. Deste modo, a yacon e o kefir, como fonte de prebióticos e probióticos, respectivamente, apresentaram efeitos benéficos na saúde intestinal e óssea, destacando o uso promissor desses alimentos para a formação e manutenção da homeostase intestinal e óssea humana.

Palavras-chave: probióticos, prebióticos, simbióticos, saúde óssea, saúde intestinal.

ABSTRACT

GOMES, ANAMARES FERREIRA. Evaluation of the effects of consumption of yacon (*Smallanthus sonchifolius*), kefir and yacon associated with kefir on intestinal and bone health in rats. 2020. Dissertation (Master degree in Food Science and Technology) – Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Dr. Neuza Maria Brunoro Costa. Co-advisors: Dr Mirelle Lomar Viana, and Dr. Maria das Graças Vaz Tostes.

Kefir is a functional food that has a great source of natural probiotics that provides benefits to the host's intestinal health. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a tuberous root from the Andes region, rich in fructooligosaccharides (FOS), with prebiotic properties that increase the absorption of various minerals, such as calcium, and increase bone mineralization. This study aimed to evaluate both prebiotic and probiotic properties of yacon and kefir, respectively, and the symbiotic action of the association between them in the intestinal and bone health in rats. Adult Wistar rats were divided into 4 groups: Control (C), kefir (K), Yacon (Y) and yacon + kefir (YK), and fed with their experimental diets for 42 days. Group C received the standard diet AIN-93 M and 1 ml / day of whole cow's milk; group K received the same diet and 1mL / day of the kefir fermented drink containing 10^8 CFU / mL; group Y received yacon flour in sufficient quantities to provide 5% FOS and 1 mL / day of whole cow's milk, and group YK received the same diet of yacon flour and 1 mL / day of the kefir drink. In the last week, the animals were transferred to metabolic cages to collect 24-hour urine for analysis of intestinal permeability. For this, the animals received via gavage, 1 mL of a solution containing 200 mg of lactulose and 100 mg of mannitol. Feces and urine were collected for 5 days to determine apparent absorption and calcium balance. Blood sample was collected for analysis of serum biomarkers of bone formation Osteocalcin, and bone resorption, type I collagen N-telopeptides (NTx) and type I collagen C-telopeptide (Ctx). The contents of the large intestine were collected for analysis of intraluminal pH and secretory immunoglobulin A (sIgA). The administration of kefir and yacon alone, favored the integrity of the intestinal mucosa, decreasing intestinal permeability, by decreasing the concentration of lactulose and mannitol in the urine, the symbiotic reduced the excretion of mannitol but not lactulose. Both kefir, yacon and symbiotic were able to reduce intestinal pH, but only kefir and symbiotic were effective

on increasing levels of sIgA. There was no difference in apparent calcium absorption ($p>0.05$) between the groups, however the symbiotic was efficient in the calcium balance and kefir proved to be effective in preventing bone resorption, reducing the levels of osteoclastic markers, Ctx and Ntx. Yacon was effective in bone formation, increasing osteocalcin levels. The combination of yacon and kefir did not present the expected symbiotic result, since it did not significantly favor bone and intestinal health of the animals, that is, the values obtained for the symbiotic were intermediate between the positive effects of yacon and kefir alone. Therefore, yacon and kefir, as a source of prebiotics and probiotics, respectively, presented beneficial effects on intestinal and bone health, highlighting the promising use of these foods for the formation and maintenance of human intestinal and bone homeostasis

Keywords: probiotics, prebiotics, symbiotics, bone health, intestinal health

1. INTRODUÇÃO	12
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Metabolismo ósseo	15
3.2 Saúde intestinal e homeostase óssea.....	16
3.3 Prebióticos	16
3.4 Yacon	17
3.5 Prebióticos, com efeito protetor ósseo	20
3.4 Probióticos	21
3.5 Kefir.....	22
3.6 Probióticos e saúde mineral	23
3.7 Simbióticos.....	25
3.8 Simbióticos e saúde mineral	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 <i>Elaboração da farinha de yacon</i>	27
4.2 Determinação da composição química da farinha de yacon	28
4.2.1 Caracterização e quantificação dos açúcares	28
4.2.2 Determinação da umidade, cinzas, proteínas e lipídeos	28
4.2.3 Umidade.....	28
4.2.4 Cinzas	29
4.2.5 Determinação de fibra alimentar	29
4.2.6 Determinação do teor de cálcio.....	30
4.3 Cultivo dos grãos de kefir.....	30
4.3.1 Determinação do pH e acidez titulável do kefir	31
4.3.2 Análises microbiológicas do kefir	32
4.4 <i>Ensaio biológico</i>	32
4.4.1 Delineamento experimental.....	32
4.4.2 <i>Balanço mineral</i>	36
4.5 Dosagem dos Biomarcadores ósseos.....	36
4.6 <i>Integridade intestinal</i>	36

4.6.1 Permeabilidade intestinal	36
4.6.2 pH intraluminal do Colón	37
4.6.3 Imunoglobulina secretória A (sIgA)	38
4.6.4 Análises estatísticas.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Consumo alimentar e alteração ponderal.....	39
5.2 pH intraluminal	40
5.3 Absorção aparente de Cálcio e balanço mineral.....	41
5.4 Permeabilidade intestinal	43
5.5 Produção de Imunoglobulina secretória A (sIgA)	44
5.6 Biomarcadores ósseos.....	45
6- CONCLUSÃO.....	47

1. INTRODUÇÃO

Conforme a população envelhece e a expectativa de vida aumenta, patologias relacionadas a idade se tornam mais prevalentes. A manutenção e perda óssea está fortemente relacionada ao estilo de vida e a dieta, uma dieta saudável pode auxiliar na redução do risco e no controle da progressão da osteoporose e de distúrbios musculoesqueléticos. Os alimentos com propriedades funcionais podem auxiliar na redução do risco de doenças e agravos crônicos não transmissíveis (DACNT). Dentre os alimentos funcionais, os probióticos, prebióticos e simbióticos podem ser citados (HIROTA e HIROTA, 2019; NELKE et al., 2019).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro desde que tenham sido ingeridos em número suficiente e sobrevivam ao trânsito gastrointestinal (HILL et al., 2014; ISAPP, 2013).

Os prebióticos foram inicialmente definidos por Gibson e Roberfroid (1995) como ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade de um número limitado de bactérias no cólon (probióticos), conferindo benefícios à saúde. Recentemente, uma definição de prebiótico como senso comum foi proposta pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) como substrato utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem benefícios à saúde (GIBSON et al., 2017).

Simbióticos consistem de uma combinação de prebióticos e probióticos que agem sinergicamente para promover bactérias gastrointestinais saudáveis (GUARNER et al., 2012). Há, portanto, a expectativa de que, com a ingestão do simbiótico, o ingrediente prebiótico promova a sobrevivência do probiótico no produto e no trato gastrointestinal e, ou seu crescimento no cólon (GRIMOUD et al., 2010)

O kefir representa uma grande fonte de probióticos naturais e pode ser facilmente digerido (SATIR e GUZEL-SEYDIM, 2016). Os probióticos têm sido associados a várias propriedades imunomodulatórias e têm o potencial de melhorar várias condições inflamatórias, incluindo osteoporose (DAR et al., 2018).

A yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa originária na região dos Andes considerada um alimento funcional, principalmente por ser rica em

frutooligossacarídeos (FOS), os quais possuem propriedades prebióticas (CAETANO et al., 2016). Alguns efeitos atribuídos aos prebióticos são a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio e a modulação da composição da microbiota intestinal (ROBERFROID, 2002).

Ao serem fermentados no cólon, os prebióticos produzem ácidos graxos de cadeia curta, promovem aumento da massa fecal, redução do pH do cólon, melhoria do sistema imunológico e promovem o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no trato gastrointestinal (DWIVEDI et al., 2014; LEE e SALMINEN 2009).

É crescente o número de estudos que relacionam ingestão regular de probióticos e prebióticos à saúde óssea (DA SILVA et al., 2019; SCHOLZ-AHRENS et al., 2016; TANABE et al., 2019). Embora o intestino delgado seja a maior região de absorção de cálcio nos seres humanos, quantidades significativas podem ser absorvidas por todo o intestino, inclusive no cólon, (ASHWINI et al., 2019).

A microbiota intestinal pode influenciar muitos aspectos da imunidade, incluindo o desenvolvimento, função e diferenciação de células imunes. O metabólito bacteriano ácido graxo de cadeia curta (AGCC) atua na regulação da diferenciação de células T, envolvidas diretamente na homeostase óssea pois regulam a remodelagem óssea, extremamente importante em doenças ósseas inflamatórias, como a osteoporose (VILLA et al., 2017).

Ainda que a maioria dos dados disponíveis aponte para uma melhor biodisponibilidade de minerais, é crescente o número de estudos que apontam para um possível eixo de sinalização intestino-osso com a participação de microrganismos da microbiota intestinal. Este conceito amplia a compreensão do papel do intestino na saúde óssea além de apenas favorecer a absorção de minerais (VILLA et al. 2017; WHISNER e CASTILLO, 2018).

O consumo de probióticos e prebióticos pode ser uma novidade na abordagem para controlar a perda óssea via modulação do sistema imune do paciente. Além disso, os tratamentos convencionais para perda óssea têm efeitos colaterais indesejados como desconforto gastrointestinal, dor musculoesquelética e hipocalcemia, além disso, nem sempre são eficazes (DAR, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as propriedades prebióticas do yacon e probióticas do kefir e da ação simbiótica da associação entre eles na saúde intestinal e óssea em ratos.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Investigar o efeito do yacon, do kefir e da associação entre eles no consumo alimentar e alteração ponderal;
- 2) Avaliar a influência do yacon, do kefir e da combinação entre eles na integridade intestinal através da análise dos parâmetros intestinais de alteração do pH cecal, permeabilidade intestinal e a produção de imunoglobulina secretória A (sIgA);
- 3) Avaliar o efeito do consumo de yacon e kefir na saúde óssea, por meio da absorção mineral e concentração de biomarcadores de formação e reabsorção óssea.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Metabolismo ósseo

O osso é um órgão dinâmico que sofre remodelações constantes durante todas as fases da vida. O esqueleto adulto contém três tipos principais de células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteócitos, são localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea tornando possível a difusão de nutrientes. Os osteoblastos são as células responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas, são os precursores dos osteócitos. Osteoclastos derivam de células mononuclear-fagocíticas, extensamente ramificadas, derivadas de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Eles estão presentes nas lacunas de reabsorção do osso trabecular e funcionam como células de resorção óssea. A saúde óssea depende do equilíbrio entre as células osteoblásticas de formação óssea e osteoclásticas de reabsorção (DE MARTINIS et al., 2020; DI CHEN et al., 2019 QUACH e BRITTON, 2017; SCHEPPER et al., 2017).

A infraestrutura do colágeno sofre um processo contínuo de remodelação que envolve reabsorção e formação óssea mediada por osteoclastos. A reabsorção óssea pelos osteoclastos resulta na produção do N-telopeptídeos do colágeno tipo-I (NTx) (GINALDI et al., 2015)

O sistema esquelético é responsável pela homeostase de cálcio ionizado sanguíneo por meio da remodelação óssea. A remodelação óssea é realizada por meio de hormônios sistêmicos e algumas citocinas. Hormônios importantes estão envolvidos na remodelação, paratormônio (PTH) e a 1,25 diidroxivitamina D3, influenciando na atividade dos osteoclastos e os esteróides sexuais que atuam para inibir a reabsorção óssea (CASHMAN,2002; GUÉGUEN e POINTILLART, 2000; VONDRACECK, 2004).

Vários tipos de patologias podem estimular a perda óssea por impactar as atividades dos osteoblastos e osteoclastos, como deficiência de estrogênio e condições inflamatórias, através do aumento da produção de citocinas inflamatórias, interleucina (IL-1,IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e à ativação do receptor

nuclear- κ β (RANKL) na medula óssea, que promovem a diferenciação e atividade dos osteoclastos (MAJUMDER et al., 2016).

3.2 Saúde intestinal e homeostase óssea

O sistema imunológico e a microbiota intestinal do hospedeiro interagem entre si em um equilíbrio dinâmico desempenhando papéis fundamentais na homeostase óssea, que influencia a massa óssea. A microbiota intestinal modula o sistema imunológico através da produção de moléculas com função imunomodulatória e anti-inflamatória capaz de influenciar as células imunes (WU et al., 2016).

Os probióticos podem inibir a atividade dos osteoclastos e reduzir o nível de expressão de fatores inflamatórios. Além disso, pode promover a absorção de cálcio ósseo e aumentar significativamente a expressão de marcadores osteogênicos, podem reduzir o pH intestinal e melhorar a absorção de cálcio (LI et al., 2019)

As bactérias expressam genes em resposta às mudanças no ambiente. Tais genes codificam enzimas envolvidas na produção de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta, derivados de ácidos biliares e vitaminas, por exemplo. Essa produção depende da disponibilidade de substrato, que podem ser em parte, fornecidos por prebióticos (MCCABE et al., 2015).

Distúrbios da microbiota intestinal podem aumentar a permeabilidade das células intestinais, o que causa maior concentração de Lipopolissacarídeo (LPS) no sistema circulatório, ativando a resposta imune. O LPS pode regular positivamente os mediadores inflamatórios, interleucina (IL) -1, ciclooxigenase (COX) -2 e TNF na região metafisária óssea. Distúrbios da microbiota intestinal podem aumentar o pH intestinal e diminuir a absorção de cálcio (SUN e O'RIORDAN, 2013).

3.3 Prebióticos

A importância da composição da microbiota intestinal é atribuída ao seu envolvimento no desenvolvimento da mucosa gastrointestinal, sistema imunológico, manutenção de um estado fisiológico normal e produção de nutrientes, como vitaminas. A disponibilidade e composição de nutrientes pode moldar a constituição da microbiota intestinal (PEREIRA e BERRY, 2017; ROBERFROID et al., 2010).

Os prebióticos são definidos como ‘Substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem benefício à saúde’ (GIBSON et al., 2017). Essa definição expande o conceito de prebióticos para incluir não carboidratos, aplicações em locais corporais diferentes do trato gastrointestinal e categorias diversas além dos alimentos, como por exemplo, em cosméticos usado para inibir a atividade fisiológica e crescimento de bactérias indesejáveis da pele (MOHANTY et al., 2018).

São encontrados em grupos de alimentos muito diversos e em uma ampla gama de suplementos, ocorrem naturalmente em alimentos como leguminosas, frutas e hortaliças, sendo as principais fontes trigo, aveia, feijão, grão de bico, alho-poró, aspargos, cebola, trigo, alho, chicória, aveia, soja, yacon, alcachofra de Jerusalém (SCHAAFSMA e SLAVIN 2015; MOHANTY et al. 2018; CAETANO et al., 2016).

Prebióticos não são digeridos no trato gastrointestinal, sendo metabolizados pela microbiota colônica. A fermentação é realizada por bactérias anaeróbicas do cólon, levando à produção de ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta e gases. Conseqüentemente, há redução do pH do lúmen e estimulação da proliferação de células epiteliais do cólon, resultando em crescimento de certas espécies bacterianas e a liberação de metabólitos, como ácidos graxos de cadeia curta. (FREI et al., 2015; SAAD 2006).

O aumento do mercado de alimentos funcionais, especificamente em relação aos alimentos que contêm prebióticos, foi grande nos últimos 20 anos. É esperado que o mercado global prebiótico continue a expandir, ultrapassando US\$ 7,5 bilhões em vendas até 2023 (INSIGHTS, Global Market, 2017).

3.4 Yacon

A yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa originária na região dos Andes e se espelhou para Nova Zelândia, Japão e Brasil, sendo também cultivada nos EUA e Rússia. Yacon armazena seus carboidratos na forma de frutooligossacarídeos (FOS), oligômeros de frutose unidos por ligações β -(2→1) ou β -(2→6) e uma molécula de glicose ligada à frutose por α -(2→1), passa pelo estômago e intestino delgado sem ser absorvido ou degradado e atinge o cólon intacto, sendo completamente fermentados no cólon por bifidobactérias promovendo efeitos benéficos à saúde. Por esse motivo, é considerada um alimento funcional com

propriedades prebióticas (CAETANO et al.,2016; FERNÁNDEZ et al.2013; GIBSON et al. 2017).

As raízes de yacon contêm compostos fenólicos, antioxidantes naturais que ajudam a prevenir a ação deletéria dos radicais livres no corpo. Os minerais mais abundantes em yacon são cálcio e potássio. As folhas de yacon também contêm compostos bioativos, como ácidos fenólicos, ácidos protocáricos, clorogênicos, cafeicos e ferúlicos, que conferem propriedades antidiabéticas e antioxidantes às infusões feitas a partir das folhas (CAMPOS et al., 2012; DELGADO et al., 2013; HONORÉ et al., 2015).

A composição química das folhas e tubérculos do yacon pode variar dependendo de fatores, incluindo local de plantio, estação de crescimento e época de colheita. A proporção de FOS para açúcares livres depende do estágio de desenvolvimento da cultura, bem como do tempo e da temperatura de armazenamento pós-colheita (YAN et al., 2019).

Yacon é geralmente consumida descascada e fresca, como uma fruta e em salada de frutas, também pode ser assada em forno ou consumido na forma de uma bebida extraindo seu suco. A raiz yacon escurece rapidamente no armazenamento mesmo a baixas temperaturas. A farinha de yacon pode ser uma boa alternativa de uso, a secagem da polpa de yacon para obtenção da farinha aumenta a concentração dos componentes funcionais, como o FOS e a inulina, a farinha de yacon pode ser empregada como ingrediente funcional na formulação de diversos alimentos processados como bolos, biscoitos, doces e pães (DELGADO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2010).

Os produtos finais da fermentação de frutooligossacarídeos (FOS) pela microbiota intestinal, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), atuam como substratos ou moléculas de sinalização na regulação da resposta imune (PEREIRA et al., 2016; SUN e O'RIORDAN, 2013).

O consumo de yacon foi investigado para melhorar a resposta imune intestinal por meio da concentração de imunoglobulina A (IgA) em crianças pré escolares (VAZ-TOSTES et al., 2014), maior produção fecal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), aumento do número de células T e redução da expressão do fator de transcrição ROR γ t no cólon (MARCON et al., 2019). A yacon também está associada a resposta

imunológica intestinal, redução da inflamação e um risco reduzido de câncer colorretal em modelo murino (GRANCIERI et al. 2017; VERIDIANO et al., 2020).

Yacon reduz o pH intraluminal, o que favorece a solubilidade mineral. A yacon aumentou a biodisponibilidade mineral de cálcio e magnésio em ratos suplementados com farinha de yacon (LOBO et al., 2007). Yacon também se mostrou capaz de neutralizar efeitos deletérios sobre marcadores hemáticos em dente com sobrecarga moderada de ferro em ratos (COCATO et al., 2019). Aumenta a largura, a altura e a profundidade de criptas no ceco, fator que contribui para o aumento da absorção intestinal de cálcio, magnésio e ferro além da deposição de cálcio nos ossos (SOUZA et al., 2018).

A ingestão de FOS provoca um efeito bifidogênico ao estimular seletivamente a proliferação de bifidobactérias, um grupo de bactérias benéficas naturalmente encontradas no cólon humano, homeostase glicêmica, metabolismo lipídico, inibem a multiplicação de patógenos, além disso, atuam como um sinal para a regulação genética da virulência em patógenos entéricos comuns (Figura 1).

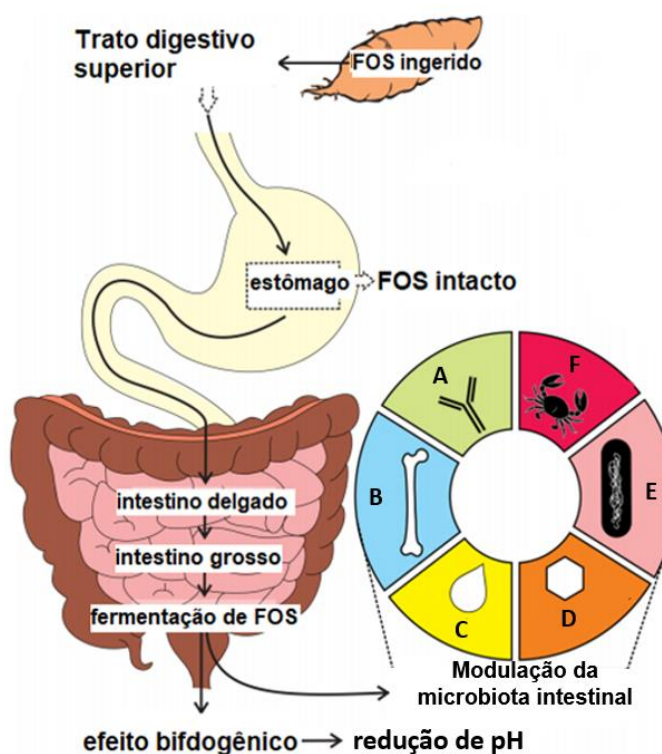


Figura 1- Consumo de yacon e os principais benefícios promotores de saúde. Ao ser ingerido, FOS chega ao cólon intacto, onde é fermentado liberando ácidos orgânicos,

ocasionando na redução de pH intraluminal o que vai promover: A:imunomodulação; B:absorção mineral; C:metabolismo lipídico; D:homeostase glicêmica; E:inibição patogênica; F: Efeito anticarcinogênico. Fonte: adaptado de CAETANO et al., (2016).

3.5 Prebióticos, com efeito protetor ósseo

Os prebióticos têm efeitos benéficos em diversos aspectos da saúde incluindo saúde óssea. Compostos prebióticos como oligofrutose e inulina aumentam a biodisponibilidade de cálcio, por meio da fermentação microbiana destes compostos, o que vai resultar em diminuição de pH nos conteúdos do íleo, ceco e cólon, ocasionando no aumento da concentração de minerais ionizados, condição que facilita a difusão passiva, aumentando a concentração de cálcio, fósforo, fosfato e, em menor grau, magnésio, no ceco. A fermentação microbiana também acarreta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que possuem efeito osmótico, no trato gastrointestinal, resultando na transferência de água para o intestino grosso, favorecendo a solubilidade do cálcio (SAAD 2006; SLAVIN, 2013; TOUSEN et al., 2016).

A maior biodisponibilidade do cálcio no cólon poderia ser, também, resultante da hidrólise do complexo cálcio-fitato, por ação de fitases liberadoras por enzimas bacterianas (SAAD 2006).

Os oligossacarídeos não digeríveis são considerados os prebióticos mais promissores para a saúde óssea. Exemplos destes oligossacarídeos incluem lactulose, galactooligosacarídeos (GOS), frutooligosacarídeos (FOS), inulina e oligofrutose (WHISNER e CASTILLO, 2018).

Oligossacarídeos demonstraram sua eficácia no aumento da absorção de minerais, protegendo contra a perda óssea acarretando no aumento da força, rigidez e elasticidade óssea (Tabela 1).

Tabela 1- Resumo de tratamentos prebióticos para avaliar sua eficácia na alteração da absorção de minerais, refletindo na saúde óssea.

Prebiótico/ composto	Dose e duração	Conclusões	Referência
Inulina enriquecida com oligofrutose	10 g; 3 meses	Aumento das taxas de formação óssea e diminuição das taxas de reabsorção óssea.	DRABIŃSKA et al. 2019.
Inulina	Solução 7% de inulina (v/v); 6 semanas	Aumento da absorção mineral, aumento ácidos graxos de cadeia curta no ceco.	KRUPA-KOZAK et al., 2017
FOS	1,85 g/kg; 12 semanas	Os FOS protegeram contra a perda óssea, aumentaram seletivamente marcadores osteogênicos e o butirato no sangue.	PORWAL et al.,2020
GOS/FOS	2,5% do teor da dieta;	A mistura GOS/FOS aumentou o teor de Ctx diminuiu e a força, rigidez e elasticidade óssea aumentaram.	SEIJO et al., 2019.
GOS/FOS	5,3% do teor da dieta;7 semanas	O teor de Ca e P, as colônias de Lactobacillus foram maiores nas fezes dos grupos de tratamento e menor pH cecal.	BRYK et al., 2015
Lactulose	20 g/kg; 6 semanas	Redução dos níveis de CTx, alterou benéficamente a microbiota intestinal, aumentou o teor de AGCC nas fezes, reduziu os níveis de citocinas pró-osteoclastogênicas e aumentou a citocina anti-inflamatória IL-10.	CHEN et al., 2020

FOS: frutooligossacarídeos; GOS: Galactooligossacarídeos. Fonte: A autora (2020).

3.4 Probióticos

A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) define os probióticos como ‘microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro’ desde que

tenham sido ingeridos em número suficiente e sobrevivam ao trânsito gastrointestinal (HILL et al., 2014).

O meio de ação dos probióticos em favorecer a saúde humana inclui fatores como efeito antagonista, por meio de produção de substâncias antimicrobianas, competição contra microrganismos patogênicos por adesão ao epitélio e oferta de nutrientes, imunomodulação do hospedeiro, por meio da ativação de mecanismos naturais de defesa e inibição de produção de toxinas bacterianas (ARKOWIAK e ŚLIŻEWSKA, 2017; SAAD, 2006).

Com relação a função dos probióticos na saúde do hospedeiro, salienta-se o controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; melhoria da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; promoção da digestão da lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; produção de vitaminas e melhoria da absorção mineral (PARK et al., 2018; PAKDAMAN et al., 2015; QUIGLEY et al., 2019; SAAD, 2006). Além disso, a composição da microbiota intestinal afeta o sistemas cardiovascular, neural, imunológico e metabólico (AZAD et al., 2018)

Os probióticos são promissores da saúde, usados tanto como terapia adicional a algum tratamento específico como um suplemento na saúde de modo geral. Deve-se enfatizar que tal efeito limita-se a promoção de saúde e não a cura de doenças (ABID e KOH, 2019; SANDERS, 2003).

3.5 Kefir

O kefir é uma simbiose complexa que formam grãos ou estruturas semelhantes a couve-flor. Além de bactérias e leveduras benéficas á saúde do hospedeiro, é rico em aminoácidos, vitaminas, minerais e enzimas. Principalmente cálcio, fósforo, magnésio, vitaminas K, B₂, B₁₂, A e D. Também possui propriedades antioxidantes e terapêuticas (GAWARE et al., 2011).

A sua origem é caucasiana e tibetana, preparado á partir da incubação de grãos de kefir com leite cru ou água (SHARIFI et al., 2017). Os grãos kefir são compostos por uma microflora diferenciada que inclui bactérias ácidas lácticas (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus parabuchneri* e *Acetobacter lovaniensis*) e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Os principais metabólitos da

fermentação do kefir são o ácido lático, etanol e o CO₂, que conferem a esta bebida viscosidade, acidez e um leve teor alcoólico (JALALI et al., 2016)

Os constituintes do kefir estão envolvidos na síntese de componentes bioativos anticancerígenos, antiinflamatórios, antimicrobianos, anti-alérgicos, imunomoduladores, cicatrizante e de inibição de enzima conversora de angiotensina. Além da produção de peptídeos bioativos, aminas biogênicas e a conversão de compostos fenólicos em compostos biologicamente ativos, bem como a redução de antinutrientes. Todas essas propriedades tem aumentado o interesse pelo kefir como foco de pesquisa e como um potencial produto probiótico (BOURRIE, WILLING e COTTER, 2016; DIMIDI et al., 2019).

O consumo regular de produtos lácteos, entre eles o kefir, tem sido investigado como uma abordagem mais segura, econômica e natural, como coadjuvante no tratamento de doenças ósseas como a osteoporose, pois além de serem uma fonte de cálcio podem reduzir a reabsorção óssea (FARDELLONE et al., 2019).

Peptídeos isolados do kefir demonstraram ser eficazes em reduzir a perda de massa óssea, atuando na prevenção da osteoporose em ratas ovariectomizadas (TU et al., 2020). A ingestão regular de kefir em pacientes com osteoporose foi capaz de elevar a concentração do biomarcador de formação óssea Osteocalcina (OC) e também o hormônio da paratireóide (PTH) a níveis considerados normais mesmo em pacientes em tratamento (TU et al., 2015), comprovando assim o potencial do kefir em promover a remodelação óssea e aumentar a formação óssea.

3.6 Probióticos e saúde mineral

Pode-se afirmar que o osso é um dos órgãos mais impactado por probióticos devido à sua dependência do intestino, incluindo a absorção de minerais e de vitaminas (MCCABE et al., 2015). O osso é um órgão dinâmico que depende do equilíbrio entre os osteoblastos de formação óssea e os osteoclastos de reabsorção óssea. Um desequilíbrio nesse processo pode levar a doenças ósseas (SCHEPPER et al., 2017).

A saúde óssea é favorecida pelos probióticos por meio de produção de vitaminas D, K e ácido fólico, associados ao metabolismo de minerais, pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, aumento da absorção de cálcio, através do transporte desse mineral do intestino delgado para o grosso e do efeito osmótico da

inulina e da oligofrutose, resultando em maior solubilidade do cálcio (RAJPUT et al., 2018; SAAD, 2006).

O estado antioxidante reduz a diferenciação dos osteoclastos, diminui os níveis de citocinas pró inflamatórias e aumenta a absorção de cálcio nos ossos (RAJPUT, 2018). Os probióticos parecem agir como estrogênio na regulação osteoimune, fortalecendo a estrutura do osso através da atividade das células T e também aumentando a expressão do fator de crescimento- β e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (WALSH et al., 2018).

Os probióticos agem como estrogênio na regulação osteoimune, fortalecendo a estrutura do osso através da atividade dos Linfócito T, ou células T (Walsh et al., 2018).

Grande parte dos trabalhos utilizam bactérias do ácido lático, como cepas dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*, que também estão entre os probióticos mais usados na dieta humana (QUACH e BRITTON, 2017). A seguir, são apresentados alguns trabalhos que utilizaram cepas probióticas isoladas para investigar o efeito desses componentes na saúde óssea (Tabela 2).

Tabela 2- Resumo de tratamentos probióticos com o objetivo de melhorar a saúde óssea.

Componente probiótico	Conclusão	Referência
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Inibição de perda óssea através do mecanismo de modulação do equilíbrio das células T	DAR et al., 2018.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Aumento do volume ósseo trabecular e regulação do anabolismo ósseo mediada por células T.	TYAGI et al., 2018.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ativação dos osteoclastos em ratas ovariectomizadas	YAMADA et al., 2019.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Aumentos dos marcadores osteoblásticos aumento da formação óssea.	MCCABE et al., 2013.
<i>Lactobacillus kefir</i>	Aumento de osteocalcina sérica, paratireóide sérico (PTH), aumento de densidade mineral óssea e diminuição do β -CTx.	TU et al., 2015.

Fonte: a autora (2020).

Grande parte dos estudos são realizados, seja eles com humanos ou animais, mulheres e fêmeas respectivamente, portador de alguma doença óssea ou agravos crônicos não transmissíveis (DACNT). Não foi observado na literatura, estudos com homens ou machos, sadios.

3.7 Simbióticos

Os simbióticos foram definidos inicialmente (GIBSON e ROBERFROID, 1995), como sendo a 'mistura de prebióticos e probióticos que fornece o benefício de ambos, principalmente em razão dos efeitos sinérgicos'. Desde a sua introdução, este conceito não foi redefinido. Entretanto, com base na evolução dos termos probióticos e prebióticos, um simbiótico deve consistir em probióticos e prebióticos e o prebiótico deve suportar seletivamente o crescimento do componente probiótico, melhorando o

bem-estar do hospedeiro (KOLIDA e GIBSON, 2011). Os simbióticos têm uma maior eficácia, em comparação com qualquer probiótico ou prebiótico usados isoladamente (MOHANTY et al., 2018).

Existem dois tipos de abordagens, baseadas na definição atual: a) complementar, o probiótico é escolhido com base em efeitos benéficos específicos desejados e o prebiótico é escolhido independentemente para aumentar seletivamente as suas concentrações e b) sinérgico, onde o prebiótico é selecionado para ter uma interação maior com o probiótico o principal objetivo é a melhoria da sobrevivência dos microrganismos probióticos no trato gastrointestinal. Entretanto, a abordagem sinérgica é mais coerente com a definição simbiótica atual (KOLIDA e GIBSON, 2011; MARKOWIAK e ŚLIŻEWSKA, 2017)

3.8 Simbióticos e saúde mineral

Simbiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e uma combinação de oligofrutose e goma-arábica promoveu efeito sinérgico na mineralização óssea, promoveu mudanças no microbioma intestinal, enquanto a remodelação óssea tendeu a ser reduzida em modelo murino (SCHOLZ-AHRENS et al., 2016).

Em estudo utilizando como componente probiótico do simbiótico *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, e *Bifidobacterium bifidum* e o componente prebiótico uma mistura de galacto-oligosacarídeos (GOS) em humanos obesos submetidos à dieta severa de perda de peso, concluiu que a mistura simbiótica não mostrou diferenças estatisticamente significativas de teor mineral ósseo em relação ao grupo placebo, entretanto modulou o microbioma intestinal aumentando a abundância de espécies microbianas potencialmente benéficas (SERGEEV et al., 2020).

A saúde mineral é favorecida pela ingestão de prebióticos, probióticos e simbióticos, a ingestão de yacon e kefir pode favorecer a saúde óssea, alterando as concentrações de biomarcadores de formação e reabsorção óssea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Nutrição Experimental e Fisiologia Humana, Central Analítica, Operações Unitárias e Química de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES.

4.1 Elaboração da farinha de yacon

A yacon utilizada para a elaboração da farinha foi adquirida com produtor da região de Santa Maria de Jetibá/ES, sendo todas do mesmo lote. A farinha foi produzida em uma única batelada.

As raízes tuberosas foram pré-higienizadas em água corrente e, logo após, sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos. Depois, foram descascadas com auxílio de um descascador e fatiadas com um processador em forma de lâminas. Após esse procedimento, foram imersas em solução contendo 1% de ácido cítrico, sendo drenadas e secas com auxílio de bandejas em secador com circulação de ar, a 60°C por 72 horas ou até temperatura constante. Após a secagem, foram trituradas em moinho de facas para obtenção da farinha. A farinha foi embalada em embalagens poliméricas do tipo *Stand Up Pouch*. Ao final do processo, a farinha foi armazenada à temperatura de 4°C. Com resultado final, foi obtida uma farinha de coloração escura e bem fina (Figura 1).

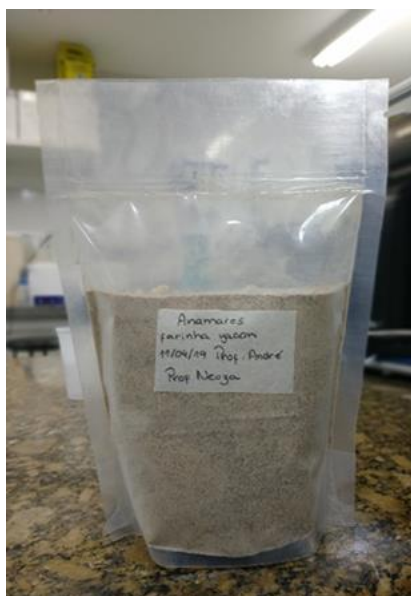


Figura 2- Farinha de yacon embaladas em embalagens do tipo *Stand Up Pouch*.

4.2 Determinação da composição química da farinha de yacon

4.2.1 Caracterização e quantificação dos açúcares

A análise da composição de oligofrutanos, inulina e os açúcares (glicose, frutose e sacarose) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo da marca VARIAN, modelo Pró-Star 410, com detector de índice de refração e injetor automático (AUTO SAMPLER 410), a coluna utilizada foi HPX 87P, marca BIORAD, fase estacionária chumbo, fase móvel água purificada. A amostra foi diluída ajustando a concentração para 1°Brix e em seguida colocada em banho-maria a 45°C com agitação durante 30 minutos para facilitar a solubilidade dos açúcares presentes e foi centrifugada a 12000rpm durante 10 minutos. Em seguida, filtrada em membrana de decafluoreto de polivinil (PVDF) da Millipore com 0,22 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro com auxílio de um roldar e seringa de 1 ml, para reter o material sólido e colocado em frasco do injetor automático (vial). Por fim, as amostras foram injetadas em Cromatógrafo líquido, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 80°C, projetando uma sequência de picos que foram comparados com as curvas pré-definidas no equipamento. A quantificação dos oligofrutanos da farinha foi feita em função da porcentagem de área dos oligofrutanos em comparação à área total dos açúcares.

4.2.2 Determinação da umidade, cinzas, proteínas e lipídeos

As análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos da farinha de yacon foram realizadas de acordo com metodologia proposta pelo instituto Adolfo Lutz (1985). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3 Umidade

O teor de umidade foi determinado através do cálculo da perda de peso das amostras submetidas a Secagem direta em estufa a 105°C, durante 3 horas. Resfriada em dessecador até a temperatura ambiente. Pesadas. Sendo o procedimento de aquecimento e resfriamento repetido até peso constante. Para se obter o teor de umidade foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\text{Umidade} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde:

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = n° de gramas da amostra

4.2.4 Cinzas

A cinzas foram analisadas pelo método de obtenção do resíduo por incineração onde foi pesado aproximadamente 5 g da amostra em um cadinho, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. A amostra então, foi incinerada em estufa por 6 horas, resfriada e dessecador e o peso final (amostra + cadinho) anotado e subtraído do peso do recipiente seco (cadinho).

4.2.5 Determinação de fibra alimentar

Os teores de fibra alimentar solúvel e insolúvel da farinha de yacon foram determinados segundo o método enzimático-gravimétrico n° 985.29 da AOAC (1990) com modificações propostas por Lee e colaboradores (1992).

Utilizando o kit de fibra alimentar total enzimático da marca Megazyme®, seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante, utilizando-se 50 µL da enzima α-amilase e 100 µL de solução de protease e 200 µL de solução de amiloglucosidase, obtendo-se assim, o resíduo de fibra solúvel e insolúvel. Cada resíduo foi analisado quanto ao teor de proteínas usando o método Kjeldahl com fator 6,25 para se obter o teor (g) de proteína na amostra. Para análise de cinzas, o resíduo foi incinerado por 5 h a 525 °C.

O cálculo utilizado para determinação da quantidade de fibra total da amostra é mostrando abaixo:

$$\text{FAT\%} = \frac{\text{RT} - \text{P} - \text{C} - \text{BT}}{\text{M}} \times 100$$

Onde:

FAT= fibra alimentar total

RT = resíduo total da amostra = (P2 - P1)

BT = resíduo total do branco = (B2-B1) – Pb - Cb

C = cinzas da amostra

M = massa da tomada da amostra

P = teor de proteína

As fibras totais presentes na amostra de farinha de yacon representam a soma das fibras solúveis e insolúveis determinadas por meio desta metodologia.

4.2.6 Determinação do teor de cálcio

A determinação de cálcio foi feita por espectrometria de absorção atômica (AAS), utilizando espectrômetro modelo SavantAA da marca GBC, com comprimento de onda de 175 a 900 nm controlado por software SavantAA Windows®. Pipetou-se 1 mL da amostra e efetuou-se a digestão por via úmida, utilizando sistema de Digestão de micro-ondas MARS 6™ a 210°C e solução padrão de ácido Nítrico (HNO₃). A amostra foi transferida para tubos do tipo Falcon e armazenado sob refrigeração até o momento da leitura. Para a leitura, pipetou-se 1 mL do extrato da digestão das amostras juntamente com 2,5 mL de solução 16.000 ppm de estrôncio (Sr) completado o volume com água ultrapura e levado para a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica. Determinou-se a concentração de Ca com o auxílio da curva padrão com concentrações conhecidas de Ca de 0; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 16 e 20 mg/L. A equação abaixo apresenta o cálculo para a determinação de cálcio.

$$R = \frac{(A - B) \times 25}{1000} + \frac{1}{P}$$

Em que:

A: concentração da amostra em mg L⁻¹

B: concentração do branco

P: peso da amostra em gramas

4.3 Cultivo dos grãos de kefir

No presente estudo foi adicionado 33,33% (20 g) dos grãos de kefir e 40 mL de leite UHT, como substrato, com a finalidade de se obter 60 mL de preparado (grão +

substrato) e após agitação, o frasco foi tampado com material que permitia a circulação reduzida de ar (guardanapo de papel prendido com elástico) (Figura 2).



Figura 3- Fermentação do kefir em recipiente de vidro.

Após permanecer em fermentação por 24 horas, os grãos foram recuperados por meio de filtração, em peneira doméstica, a bebida foi então armazenada sob refrigeração (8 °C) até ser administrada aos animais. Esse processo foi realizado diariamente durante o experimento (42 dias).

4.3.1 Determinação do pH e acidez titulável do kefir

A acidez titulável foi determinada por titulação, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Para a amostra de leite fermentado pipetou-se 10 mL da amostra e diluiu-se em 10 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se 5 gotas de fenolftaleína. A amostra diluída foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até atingir a coloração rósea. A acidez titulável foi calculada utilizando a equação:

$$\frac{(V \times f \times 0,9)}{P}$$

em que:

V = volume, em mL, de solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação;

f = fator de correção da solução de NaOH 0,1 mol/L; 0,9 = fator de conversão para o ácido láctico;

P = massa, em gramas, da amostra.

O resultado para a acidez foi expresso em porcentagem de ácido láctico (g de ácido láctico/100 mL de produto).

O pH foi obtido por meio de medição direta, utilizando-se de pHmetro de bancada da marca Kasvi®.

4.3.2 Análises microbiológicas do kefir

A contagem total de bactérias ácido lácticas (BAL) foi realizada por meio de diluições decimais até 10^{-8} em triplicatas, as placas, foram incubadas com o meio de cultura Man Rogosa & Sharpe (Difco, Detroit, Estados Unidos), utilizando o método sobrecamada, a 37°C por 24h, segundo recomendado pela *American Public Health Association* (APHA, 2001).

4.4 Ensaio biológico

4.4.1 Delineamento experimental

Os 40 animais utilizados no estudo, foram distribuídos em quatro grupos com 10 animais cada:

- I. Grupo C: Grupo controle; n=10;
- II. Grupo Y: Com administração de farinha de yacon; n=10.
- III. Grupo K: Com administração de kefir; n=10.
- IV. Grupo YK: Com administração de farinha de yacon e kefir; n=10;

Os animais foram alimentados com suas dietas experimentais por 42 dias. Os animais do grupo controle (C) receberam a dieta AIN-93M e 1 mL/dia de leite UHT integral misturado à dieta. Os animais do grupo Y receberam farinha de yacon adicionada à dieta AIN-93M, na quantidade de 97,4 g/kg para fornecer 5% de FOS (LOBO et al., 2007) e 1 mL/dia de leite de vaca integral misturado à dieta. Os animais do grupo K receberam uma dose diária de 1 mL de kefir, e os do grupo YK receberam a mesma dieta do grupo Y, além de uma dose diária de 1mL de kefir, misturado a dieta.

O peso corporal (g) e a ingestão de alimentos (g) foram registrados uma vez por semana durante todo o experimento e a ingestão total (g por 42 dias) e a ingestão

diária (g por dia) foram calculadas, assim como o Coeficiente de Eficiência Alimentar (Ganho de Peso/Consumo alimentar).

Ao fim da intervenção alimentar (42º dia de experimento), os animais foram eutanasiados e a coleta de materiais biológicos foi realizada para posteriores análises.

Animais

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando $170,0 \pm 5,0$ g, por volta de 4 semanas de idade, provenientes do biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS/UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas aramadas de aço inoxidável individuais, com controle da iluminação (ciclo de luz claro/escuro), ventilação e temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e água ad libitum. O tempo de intervenção do experimento foi de 6 semanas, totalizando 42 dias de estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA), protocolo nº 25/2016.

Dietas experimentais

Os animais receberam dieta AIN-93M, seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition* (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993), para manutenção de animais adultos. Foram utilizadas 4 dietas, 2 contendo farinha de yacon, todas formuladas a partir da AIN-93M. As dietas controle e yacon foram formuladas para conter um teor de cálcio entre 0,19 e 0,20 gramas / kg de dieta. Os ingredientes complementares necessários para elaboração da dieta foram adquiridos da Prag soluções biociências© e também no comércio local. As dietas foram armazenadas em local seco e refrigerado durante o período de consumo.

A contagem de bactérias lácticas lácticas totais (UFC/g) no leite fermentado Kefir foi 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de leite fermentado, estando este valor, dentro da legislação vigente que estabelece que as contagens de bactérias lácticas totais durante o seu período de validade deverão ser, de no mínimo 10^7 UFC/g de kefir (BRASIL, 2007).

A composição das dietas experimentais segue a seguir (Tabela 3)

Tabela 3- Composição das dietas experimentais (g/kg).

INGREDIENTES	GRUPO C	GRUPO K	GRUPO Y	GRUPO YK
Amido de Milho	459,5	459,5	444,5	444,5
Amido Dextrinizado	155	155	155	155
Albumina	140	140	140	140
Sacarose	100	100	67,6	67,6
Celulose	5	5	0	0
Farinha de Yacon	-	-	97,4	97,4
Óleo de Soja (mL)	40	40	40	40
Mix de Minerais	35	35	35	35
Mix de Vitaminas	10	10	10	10
Carbonato de Cálcio	6,2	6,2	6,2	6,2
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Kefir	-	1,0	-	1,0
Cálcio (g.kg ⁻¹)	1,92	1,94	1,95	1,91
Energia total (kcal)	377,8	377,8	365,6	365,6

C= dieta AIN93-M; K= dieta AIN93-M+kefir; Y= dieta AIN93-M+farinha de yacon; YK= dieta AIN93-M+farinha de yacon+ kefir.

Com o objetivo de avaliar a influência na absorção de cálcio, não foi ofertada na dieta a quantidade diária total recomendada para a manutenção dos animais, sendo ofertados apenas 50% das necessidades diárias de cálcio aos ratos, desta forma o mix de minerais utilizado não continha cálcio, então foi adicionado carbonato de cálcio na preparação de ambas as dietas. Todas as dietas apresentaram o mesmo teor de fibras. Para os grupos C e K foi utilizada a celulose como fonte de fibras, já para os grupos Y e YK, as fibras ofertadas foram provenientes da farinha de yacon, totalizando 5% de fibras, sendo em sua maioria oligofrutanos, em ambas as dietas. Sacarose também foi reduzida nos grupos que receberam yacon, em função da composição de açúcares simples presentes na farinha.

A composição da farinha de yacon utilizada nas dietas segue baixo (Tabela 4).

Tabela 4- Caracterização físico-química da farinha de yacon usada no preparo das dietas.

Componentes	(g /100g)
Umidade	6,97
Proteínas	3,18
Lipídios	0,78
Cinzas	5,96
Fibra alimentar solúvel (FS) ¹	9,24
Fibra alimentar insolúvel (FI) ¹	6,58
Carboidratos totais*	67,29
Glicose ²	8,64
Frutose ²	9,81
Sacarose ²	14,87
Oligofrutano ²	24,43
Inulina ²	7,52
FOS ²	19,39
Fibras probióticas ³	51,34
Valor calórico (kcal.g ⁻¹)	148,1

¹ Determinados pelo método n°985.29 AOAC (1990); ² Determinados por HPLC; ³ Soma de oligofrutano, inulina e FOS (valor utilizado para o cálculo da quantidade de farinha de yacon a ser adicionada na dieta; *Carboidratos totais = 100 – (umidade+lipídios+proteínas+cinzas+FS+FI).

Os altos teores de fibra alimentar, principalmente a fração solúvel, como oligofrutanos, inulina e FOS, com propriedade reconhecidamente prebióticos, conferem a farinha de yacon deste estudo a alegação de funcionalidade, uma vez que alimentos sólidos contendo ≥ 3 g fibras por 100 g de alimento são considerados fonte de fibra e ≥ 6 g, alimento com alto teor de fibras (BRASIL, 1998).

Eutanásia

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal de 0,2 mL/100 g peso corporal de solução anestésica contendo 15 mg/kg de Xilazina e 60 mg/kg de Cetamina/kg e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Após, foram centrifugados (3000 g, 10 minutos, 4°C) para obtenção do

plasma e armazenados a -80°C para posteriores análises. Foram ainda coletados o conteúdo cecal para análise de pH.

4.4.2 Balanço mineral

A coleta das fezes e da urina foi realizada na última semana do experimento, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas, durante 5 dias para avaliar os efeitos das dietas na absorção aparente e o balanço de cálcio.

As fezes foram congeladas a -20°C e posteriormente secas em estufa a 105°C, até peso constante. Após, foram moídas e as amostras em pó, bem como amostras de urina, utilizadas para análises de Ca, segundo metodologia proposta por LOBO (2007). A absorção aparente e o balanço mineral serão obtidos através das seguintes equações:

$$\text{Absorção aparente (\%)} = \frac{100 \times (\text{ingestão} - \text{excreção fecal})}{\text{Ingestão}}$$

$$\text{Balanço mineral (mmol/d ou } \mu\text{mol/d)} = \text{ingestão} - (\text{excreção fecal} + \text{excreção urinária}).$$

4.5 Dosagem dos Biomarcadores ósseos

Para dosagem de Osteocalcina, fragmento telopeptídeo C-terminal (CTX) e N-telopeptídeo (NTX) no plasma, foi dosada através do método ELISA, com placa micro ELISA pré-revestida com um anticorpo específico, utilizando kit comercial fornecido por Elabscience® (Texas-USA) com sensibilidade de 0,47 ng/mL, 0,1 ng/mL, 1,88 ng/mL, para osteocalcina, CTx e NTx, respectivamente. A densidade óptica empregada foi de 450 nm ± 2 nm. A mostra utilizada foi soro de ratos em jejum por 12 horas antes da coleta. Os cálculos foram obtidos utilizando o software HIDA Soft®.

4.6 Integridade intestinal

4.6.1 Permeabilidade intestinal

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado na última semana do experimento. Os animais foram alocados em gaiolas metabólicas, e permaneceram em jejum durante 12 horas. No entanto, os mesmos tiveram livre acesso à água ultra pura.

Os animais receberam, via gavagem, 1 mL de uma solução contendo 200 mg de lactulose (Arte Nativa®, Brasil) e 100 mg de manitol/1mL (Sigma-Aldrich®, EUA).

Após 1 hora de administração os animais puderam consumir água *ad libitum*, e após 6 horas dieta. Toda a urina excretada nas subseqüentes 24 h foi coletada, dosada e centrifugada a 3000 g por 10 minutos, para eliminar impurezas. Esses resultados foram usados para calcular a relação de lactulose / manitol (L/M), obtida por meio da divisão da excreção urinária (%) de lactulose por manitol. As amostras foram armazenadas a -80 °C para a posterior dosagem dos açúcares.

Para determinação das concentrações de lactulose e manitol, a amostra de urina obtida foi filtrada em filtros Millipore de 0,45 mm aproximadamente 1,5 mL foi armazenado em vials para HPLC. As análises por HPLC foram realizadas a 65°C, sob condições isocráticas. A fase móvel consistiu de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,005 mol /L. A solução empregada na fase móvel foi filtrada em filtros de 0,22 mm de espessura. O fluxo da fase móvel foi 0,2 ml/min e o volume de injeção da amostra 20 µL (DE SÁ, et al., 2011). Utilizou-se HPLC, da marca Shimadzu (Kyoto, Japão). O sistema de cromatografia consistiu em desgaseificador (Modelo DGU-14A), bomba (Modelo LC-10AT), injetor automático (modelo SIL-20A), forno de coluna (Modelo CTO-10AS) e detector de UV-Vis (modelo SPD-10AV) ligado em série com um detector de índice de refração (modelo RID-10A). A coluna analítica utilizada foi Aminex HPX-87H (300 cm x 8.7 mm) da marca BIO-RAD (Califórnia, EUA). Para a padronização do teste e o adequado conhecimento dos valores medidos na unidade g/L, quantidades conhecidas de lactulose (12,5 a 0,1953mM) e manitol (25 a 0,3906 mM) foram avaliadas separadamente no HPLC, com a finalidade de se compor a equação da reta dos mesmos ($y = ax + b$).

4.6.2 pH intraluminal do Colón

Após remoção do intestino grosso dos animais, o conteúdo luminal do ceco foi retirado, pesado, uma amostra foi reservada para outras análises e o restante diluído na proporção 1:10 em solução salina e homogeneizado em vórtex. Posteriormente, a leitura do pH foi realizada por meio de pHmetro de bancada da marca Kasvi®.

4.6.3 Imunoglobulina secretória A (IgA)

O conteúdo cecal foi diluído em solução tampão fosfato (PBS), pH 7,2, na proporção de 100 mg do conteúdo/ 1,9 mL de solução, homogeneizado usando um vórtice e centrifugado a 1000 g por 20 min, a 4°C. O procedimento de preparo da amostra seguiu a metodologia do fabricante. O sobrenadante foi recolhido e avaliado com base no método de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) usando o kit da marca Elabscience® (EUA), utilizando leitor de microplacas com filtro de comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em ng/mL.

4.6.4 Análises estatísticas

Para a investigação das variáveis obtidas ao decorrer do experimento, a normalidade das observações foi verificada pelo teste *Kolmogorov–Smirnov*, sendo em caso de rejeição da normalidade realizado o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido do *pós hoc* de Dunn com α 0,05 e análise de variância (ANOVA *one way*), seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados com distribuição normal, sendo considerado significativo o $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism®, versão 8.4.3 para Windows (GraphPad Software, San Digo, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Consumo alimentar e alteração ponderal

A alteração ponderal dos animais ao decorrer do período experimental (42 dias) e o consumo alimentar é apresentada abaixo (Tabela 5).

Tabela 5- Alteração ponderal e consumo alimentar dos animais durante o experimento.

Grupos experimentais				
Variáveis	Controle	Kefir	Yacon	YK
Peso inicial(g)	175,6 ± 8,8	175,9 ± 9,6	176,9 ± 12,9	176,3 ± 11,8
Peso final(g)	295 ± 7,3 ^a	297,6 ± 18,2 ^a	294,8 ± 14,8 ^a	293,3 ± 12,7 ^a
Ganho de peso(g)	120,2 ± 14,7 ^a	121,7 ± 15,4 ^a	120,1 ± 10,3 ^a	117 ± 22,9 ^a
Consumo Alimentar(g)	533,3 ± 13,9 ^a	533,3 ± 17,2 ^a	533,3 ± 17 ^a	533,28 ± 18 ^a
CEA*	22,6 ± 3 ^a	22,5 ± 2,7 ^a	22,4 ± 1,8 ^a	21,9 ± 4,3 ^a

*CEA = Coeficiente de Eficiência Alimentar, que corresponde à relação entre o ganho de peso e o consumo de dieta;. Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A inclusão de yacon, kefir e o simbiótico (YK) não afetou o ganho de peso dos animais ao longo do período experimental, sendo as médias estatisticamente homogêneas ($p > 0,05$). De igual modo, a ingestão total de dieta e o coeficiente de eficiência Alimentar (CEA) dos animais foi semelhante em todos os grupos experimentais

A homogeneidade nos resultados observados é semelhante ao observados por outros autores (PEREIRA et al., 2016; VERIDIANO et al., 2020) em estudos com animais, onde se utiliza yacon como fonte de FOS. Embora os FOS apresente efeitos benéficos sobre a obesidade, diminuindo a ingestão alimentar, o ganho de peso e a adiposidade (ADAM et al., 2014; HIRA et al., 2018). O mesmo não foi observado neste estudo.

5.2 pH intraluminal

Os valores médios de pH obtidos dos animais ao decorrer do experimento seguem abaixo (Figura 4).

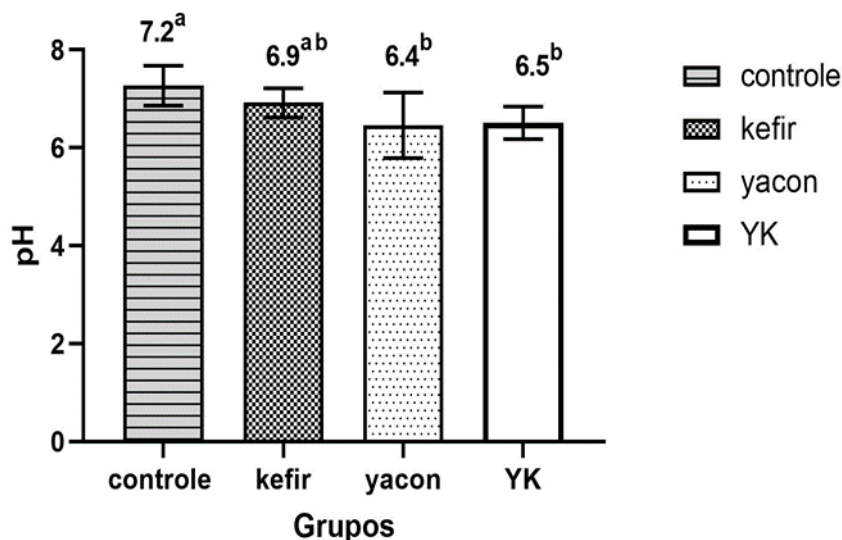


Figura 4- pH intraluminal observado dos animais.

Valores expressos como média e desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A administração das dietas contendo yacon e kefir levou a diferenças significativas dos valores de pH intraluminal em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os grupos yacon e YK apresentaram os menores valores de pH.

A fermentação de carboidratos não digeríveis oriundos da yacon, por bactérias anaeróbicas do cólon gera ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta, como propiônico e butírico, o que acarreta em redução do pH do lúmen, (SAAD, 2006).

A yacon possui ácidos fenólicos em sua composição, sobretudo os ácidos caféico e clorogênico, os quais possuem propriedades antioxidantes, atuando como agentes atenuantes de radicais livres deletérios. Os ácidos graxos, produtos finais da fermentação da microbiota intestinal, contribuem para o *pool* de energia disponível do hospedeiro, atuam como um sinal para a regulação genética da virulência em patógenos entéricos, protegendo contra mudanças patológicas na mucosa do cólon (SAAD, 2006; SUN e O'RIORDAN, 2013). A farinha de yacon foi capaz de reduzir o pH intraluminal de ratos em trabalhos anteriores (VERIDIANO et al. 2020; GRANCIERI et al., 2017).

O kefir apresenta bactérias lácticas em sua composição as quais produzem ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato, também provenientes do prebiótico, no intestino grosso, principalmente no ceco, diminuindo o pH cecal (SAAD, 2006; TREMAROLI et al., 2012).

A redução do pH no lúmen do cólon, resulta em aumento da biodisponibilidade do cálcio devido à transferência desse mineral do intestino delgado para o grosso e do aumento da solubilidade deste mineral (PEREIRA et al., 2016; SAAD, 2006). Prebióticos foram capazes de reduzir o pH nos conteúdos cecal e colônico e aliados a probióticos, preveniram a perda de cálcio em ratas ovariectomizadas (SCHOLZ-AHRENS et al., 2016), comprovando o potencial simbiótico positivo na absorção mineral.

5.3 Absorção aparente de Cálcio e balanço mineral

A absorção aparente de cálcio e o balanço mineral foi calculado e seus valores médios são apresentados a seguir (Tabela 6).

Tabela 6- Excreção fecal (g), Absorção aparente (%) e balanço mineral (mg/dia), dos animais.

Determinações	Grupos experimentais			
	Controle	Kefir	Yacon	YK
Excreção fecal (g)	4,7± 0,95 ^a	4,59 ± 0,99 ^a	3,05 ± 0,71 ^b	3,26 ± 1,42 ^b
Absorção aparente (%)	95,29 ± 0,92 ^a	95,34 ± 0,98 ^a	96,58 ± 0,88 ^a	96,48 ± 1,5 ^a
Balanço mineral Ca (mg/dia)	37,65 ± 1,38 ^c	38,31 ± 1,0 ^{bc}	39,74 ± 0,2 ^a	39,29 ± 0,74 ^{ab}

Valores expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (p> 0.05).

Não foi observada maior absorção mineral aparente em nenhum dos grupos experimentais (p>0,05).

O balanço mineral de cálcio, que consiste na diferença entre o teor de cálcio ingerido e o total excretado, foi menor nos grupos controle e kefir. O que pode ser justificado em consequência da excreção fecal (g) que foi maior nestes grupos, refletindo diretamente em maior excreção de cálcio total.

Foi observado ocorrência de diarreia em animais suplementados com farinha de yacon (grupo yacon e YK), durante todo o período experimental (42 dias), refletindo

em menor massa fecal seca (g) nesses grupos. Tal ocorrência é comum em experimentos onde se usa carboidratos resistentes à digestão como fonte prebiótica, devido ao efeito osmótico que geram no trato gastrointestinal, enquanto não ocorre a fermentação e ao serem fermentados pela microbiota intestinal fornece mais substratos na fermentação microbiana e, conseqüentemente, aumenta a emissão de gases mercaptanos totais, acarretando em sintomas de diarreia (LOBO, 2007; SAAD, 2006).

Os mecanismos prebióticos para melhorar a absorção de minerais e a saúde óssea incluem, alterações na composição da microbiota intestinal, produção de AGCC, modificação de biomarcadores, melhora do sistema imunológico e modificações no pH intestinal (WHISNER et al., 2018).

A maior biodisponibilidade de cálcio é atribuído ao efeito osmótico da inulina e da oligofrutose, o qual resulta na transferência de água para o intestino grosso, permitindo, assim, que o cálcio se torne mais solúvel, resulta também, da hidrólise do complexo cálcio-fitato, por ação de fitases bacterianas liberadoras de cálcio. A melhor absorção de cálcio é associada à redução de pH nos conteúdos do íleo, ceco e cólon. Essa redução resulta em aumento na concentração de minerais ionizados, condição esta que facilita a difusão passiva, a hipertrofia das paredes do ceco, ocasionando em aumento da largura, altura e a profundidade de criptas e também no aumento da concentração minerais como o cálcio, no ceco. (KAUR e GUPTA, 2002; SAAD, 2006; SOUZA et al., 2018).

Dieta contendo FOS, foi capaz de aumentar a taxa de absorção aparente de cálcio em pacientes pediátricos com doença celíaca (DRABIŃSKA et al., 2018). Bryk e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de uma mistura de GOS/FOS na absorção de cálcio, magnésio e fósforo em ratos em crescimento com desnutrição proteica, observaram resultados semelhantes nos grupos em que foram administrados dieta com formulação AIN93-G contendo 5,3% da mistura prebiótica.

5.4 Permeabilidade intestinal

A excreção urinária dos açúcares lactulose e manitol nos grupos experimentais é apresentada a seguir (Tabela 7)

Tabela 7- Excreção urinária de lactulose e manitol dos animais na última semana do experimento.

Variáveis	Grupos			
	Controle	Kefir	Yacon	YK
Lactulose (%)	49,64 ± 10,38 ^a	57,07 ± 16,78 ^a	19,16 ± 3,91 ^b	48,82 ± 8,22 ^a
Manitol (%)	35,19 ± 6,32 ^a	39,09 ± 10,73 ^a	19,55 ± 5,59 ^b	34,65 ± 6,99 ^a
Razão L/M	1,46 ± 0,43 ^a	1,50 ± 0,36 ^a	1,07 ± 0,4 ^a	1,45 ± 0,3 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

A excreção urinária (%) de lactulose diferiu somente no grupo yacon em relação aos demais grupos, apresentando este a menor média ($p \leq 0,05$). Com relação a taxa de excreção urinária (%) do manitol, pode-se comprovar que foi menor também no grupo yacon ($p \leq 0,05$). Os demais grupos experimentais apresentaram médias homogêneas em ambos os parâmetros ($p \geq 0,05$). A Razão entre a excreção de lactulose e manitol (L/M) não diferiu significativamente entre os grupos ($p \geq 0,05$).

A fermentação de carboidratos não digeríveis, entre eles FOS e inulina por bactérias anaeróbicas do cólon, acarreta em produção de ácidos orgânicos, reduzindo o pH do lúmen e estimulando a proliferação de células epiteliais do cólon, promovendo um aumento na camada de muco, um hidrogel que exibe um complexo seletivo de permeabilidade, permitindo a passagem de algumas partículas enquanto restringe outras, por meio de produção de mucinas (OKOLIE et al., 2017; PARIKH et al., 2019; SAAD, 2006).

Suplementação com dieta contendo 60g/kg de FOS, durante 9 dias foi capaz de reduzir o pH cecal e a permeabilidade intestinal em ratos (GENDA et al., 2018). De semelhante modo, o consumo diário de farinha de yacon (7,5%, durante 8 semanas) também foi capaz de melhorar a permeabilidade intestinal em ratos com câncer de cólon (GRANCIERI et al., 2017).

De maneira oposta ao observado neste estudo, a suplementação de kefir foi capaz de reduzir a permeabilidade intestinal em adultos obesos e também em ratos

com câncer de cólon em relação aos grupos suplementados apenas com leite de vaca (PRAŽNIKAR et al., 2020; DOS REIS, et al.,2019).

A farinha de yacon influenciou positivamente a permeabilidade intestinal, demonstrando ser eficiente em reduzir a excreção urinária dos açúcares, lactulose e manitol, o mesmo não foi observado com o kefir, tampouco a associação simbiótica de kefir com yacon (YK), apresentando estes grupos homogeneidade entre eles e em relação ao grupo controle. Deve-se ressaltar, que neste estudo os animais eram saudáveis e não tiveram a sua integridade intestinal demasiadamente comprometida, sendo assim, os demais grupos experimentais (kefir e YK) não apresentaram nenhum comportamento seja ele negativo ou positivo em relação a permeabilidade intestinal.

5.5 Produção de Imunoglobulina secretória A (sIgA)

A excreção de sIgA pela mucosa intestinal avaliada através de kit ELISA está expressa abaixo (Figura 5).

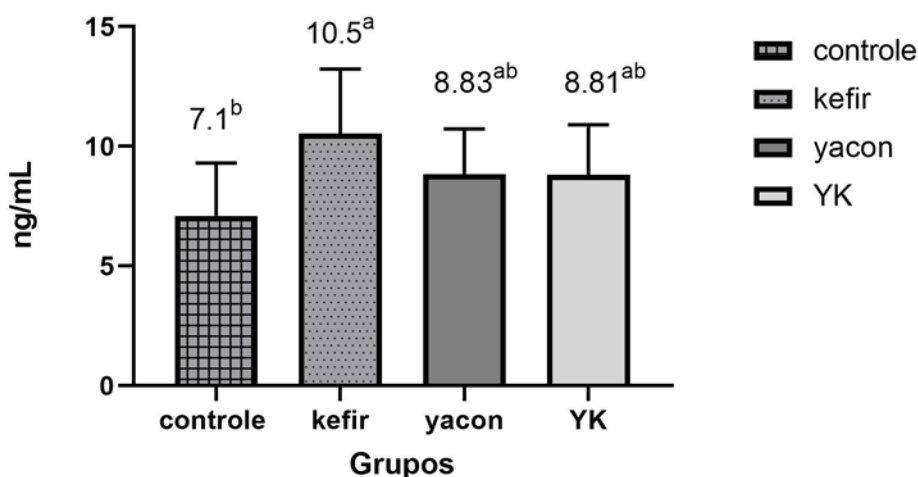


Figura 5- Concentração de sIgA (ng/mL) dos animais nos grupos experimentais.

Valores expressos como média e desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A administração das dietas contendo yacon e kefir levou ao aumento de concentração de sIgA em todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), sendo maior no grupo suplementado com kefir ($p < 0,05$).

O epitélio intestinal representa a primeira barreira física contra enteropatógenos, a capacidade de microrganismos probióticos para evitar a invasão bacteriana de células epiteliais intestinais (PABST, 2012).

A imunoglobulina secretória A (slgA), é uma importante imunoglobulina encontrada na camada de muco em altas concentrações (LEI et al., 2018). No lúmen intestinal, age como uma barreira que limita o acesso de antígenos intestinais à circulação sanguínea controlando a microbiota intestinal. (PABST, 2012).

A microbiota intestinal está relacionada ao mecanismo de imunidade humoral por meio das propriedades de aderência e a colonização dos microrganismos probióticos favorecendo a imunidade da mucosa. O kefir é investigado quanto aos seus efeitos imunológicos devido a seus peptídeos bioativos exopolissacarídeos como o kefiran, que fornecem energia para homeostase imunológica (CARASI et al., 2014; SAAD, 2006).

O probiótico também foi capaz de aumentar a slgA nas fezes de ratos que receberam o *Lactobacillus kefir*, isolado de kefir durante 21 dias (CARASI, 2014).

A yacon também aumentou a concentração de slgA em outros estudos que utilizaram modelo animal murino (DELGADO et al., 2012; VERIDIANO et al., 2020).

5.6 Biomarcadores ósseos

As concentrações dos biomarcadores séricos que expressam a remodelação e a formação óssea são expressas a seguir (Tabela 8).

Tabela 8- Concentração de biomarcadores ósseos (ng/mL).

Biomarcador (ng/mL)	Grupo			
	CONTROLE	KEFIR	YACON	YK
Ctx	5,71±1,12 ^a	4,18±0,88 ^b	5,43±1,1 ^a	4,08±0,9 ^b
Ntx	116±22,43 ^{ab}	101,9±15,45 ^b	115,8±21,8 ^{ab}	119,1±15,8 ^a
Oc	12,88±0,19 ^b	8,15±0,16 ^c	17,17±0,16 ^a	12,94±0,12 ^b

Médias com a mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0.05). Ctx: C-telopectídeo do colágeno tipo I; Ntx: N-telopectídeo do colágeno tipo I; Oc: Osteocalcina.

Os níveis de C-telopectídeo do colágeno tipo I (Ctx) foi maior no grupo Y sendo esta média igual ao grupo controle, contudo o grupo simbiótico (YK) e o grupo

probiótico (K) apresentaram os menores valores e médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

A diminuição de N-telopeptídeos do colágeno tipo-I (NTx), um fragmento de peptídeo de reabsorção óssea, foi significativo no grupo onde foi administrado kefir, o grupo prebiótico yacon (grupo Y) e o grupo controle exibiram médias homogêneas e o grupo simbiótico (YK), apresentando maiores médias ($p < 0,05$).

A concentração de osteocalcina foi significativamente maior no grupo alimentado com yacon do que nos demais grupos e o grupo kefir apresentou a menor média ($p < 0,05$). O grupo simbiótico (YK) não diferiu do grupo controle ($p > 0,05$).

O grupo alimentado com o probiótico kefir apresentou os menores níveis de marcadores osteoclásticos, Ctx e Ntx, sendo eficiente em evitar a reabsorção óssea, contudo não foi capaz de elevar os níveis do marcador osteoblástico, osteocalcina, diminuindo a perda óssea porém não promovendo a sua formação de maneira significativa ($p > 0,05$). A yacon sozinha não foi capaz de diminuir a circulação sanguínea de fragmentos do biomarcador Ctx, porém em combinação simbiótica com kefir obteve resultado satisfatório, demonstrando o potencial do kefir em diminuir a reabsorção óssea.

O teor de Ctx, um indicador de reabsorção óssea, é um bom parâmetro para avaliar os processos de formação óssea, pois é formado quando ocorre a degradação do colágeno tipo I (FORTES et al., 2014).

A osteocalcina está entre as proteínas mais abundantes no osso e é produzida exclusivamente por osteoblastos, desempenha a função de marcador sérico da formação óssea osteoblástica e atua na matriz óssea para regular a mineralização, esse biomarcador tende a reduzir com o avançar da idade (BEREZOVSKA et al., 2019; ZOCH et al., 2016).

O kefir aumentou os níveis de osteocalcina em pacientes com osteoporose, elevando o nível sanguíneo desse biomarcador, neste mesmo estudo, o kefir também foi capaz de reduzir os níveis de β telopeptida terminal C do colágeno tipo I (β -CTX), um outro indicador de reabsorção óssea, demonstrando assim, o efeito positivo deste probiótico no *turnover* ósseo em pacientes em tratamento (TU et al., 2015).

Frutooligossacarídeos (FOS) originados de Agave demonstrou ser eficiente em evitar a perda óssea e melhorou a formação óssea através do aumento dos níveis de osteocalcina sérica em ratas ovariectomizadas (GARCÍA-VIEYRA et al., 2014).

Porém, em estudo com camundongos machos, suplementados com 5% de FOS, não houve diferença na concentração de osteocalcina em relação ao grupo controle (TANABE et al., 2019).

6- CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou as propriedades prebióticas do yacon e probióticas do kefir e da ação simbiótica da combinação entre eles na saúde intestinal e óssea em ratos.

Os resultados do trabalho sugerem que o consumo de yacon e o kefir, de maneira isolada ou simbiótica, são eficientes em reduzir o pH intraluminal e a yacon de maneira isolada foi eficaz em diminuir a permeabilidade intestinal através da redução da razão lactulose/manitol.

Foi relatado que o tecido ósseo passa por um processo contínuo de remodelação, sendo o biomarcador osteoblástico de formação óssea osteocalcina, efetivo em indicar o processo de formação óssea, bem como os biomarcadores osteoclásticos de reabsorção óssea C-terminal do colágeno tipo-I (CTX) e N-telopeptídeo do colágeno tipo-I (NTX), bons indicadores do processo de remodelação. A Yacon administrada de maneira isolada, favoreceu a concentração de osteocalcina. O kefir administrado de maneira isolada, inibiu a atividade dos osteoclastos, por meio da redução dos biomarcadores CTx e NTx e reduzir o nível de expressão de fatores inflamatórios, por meio do aumento da concentração de Imunoglobulina secretória A (sIgA).

Sendo assim, prebiótico yacon e o probiótico kefir, isolados, foram eficientes em melhorar parâmetros intestinais e ósseos comprovando a eficiência de dieta preventiva prebiótica e probiótica em doenças ósseas. A junção simbiótica apresentou resultados promissores, contudo intermediários. Não há trabalhos que investigam o yacon e o kefir de forma simbiótica na saúde óssea. Este estudo salienta-se dos demais na literatura em investigar as propriedades funcionais desses dois produtos. Estudos com animais de diferentes idades, estado de saúde e tempos de intervenção diferentes são necessários para afirmar os achados deste estudo, bem como estudo com humanos utilizando yacon, kefir e a junção deles como fonte prebiótica, probiótica e simbiótica respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C - Association Of Official Analytical Chemists. method 992.16-total dietary fiber-enzymatic gravimetric method. **Official Methods of Analysis**. 18^a ed., Arlington, USA, 1990.

ABID, M. B.; KOH, C. J. Probiotics in health and disease: fooling Mother Nature. *Infection*, p. 1-7, 2019.

ADAM, C. L. et al. Different types of soluble fermentable dietary fibre decrease food intake, body weight gain and adiposity in young adult male rats. **Nutrition & metabolism**, v. 11, n. 1, p. 36, 2014.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC, 4^a ed., 2001. 676p.

ASHWINI, A. et al. Reactive mechanism and the applications of bioactive prebiotics for human health. **Journal of microbiological methods**, 2019.

AZAD, Md et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

BENGOA, A. A. et al. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 3, p. 686-700, 2019.

BEREZOVSKA, O. et al. Osteocalcin affects bone mineral and mechanical properties in female mice. **Bone**, v. 128, p. 115031, 2019.

BONGERS, A.; VAN DEN HEUVEL, E.GHM. Prebiotics and the bioavailability of minerals and trace elements. **Food Reviews International**, v. 19, n. 4, p. 397-422, 2003.

BOURRIE, B. CT; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 647, 2016.

CAETANO, B.FR et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: health-promoting benefits of fructooligosaccharides. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 436, 2016.

CAMPOS, D. et al. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1592-1599, 2012.

CARASI, P. et al. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. **BioMed Research International**, 2014.

CERDÓ, T. et al. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 635, 2019.

CHEN, X. et al. Lactulose Suppresses Osteoclastogenesis and Ameliorates Estrogen Deficiency-Induced Bone Loss in Mice. **Aging and disease**, v. 11, n. 3, p. 629, 2020.

COCATO, ML et al. Effects of a moderate iron overload and its interaction with yacon flour, and/or phytate, in the diet on liver antioxidant enzymes and hepatocyte apoptosis in rats. **Food chemistry**, v. 285, p. 171-179, 2019.

CONTIM, L. S. R. et al. Microbiological, physicochemical evaluation and sensory acceptance of kefir with graviola pulp. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 1, p. 1-9, 2018.

DA SILVA, B. P. et al. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. **Food research international**, v. 116, p. 592-599, 2019.

DAR, HY. et al. *Lactobacillus acidophilus* inhibits bone loss and increases bone heterogeneity in osteoporotic mice via modulating Treg-Th17 cell balance. **Bone reports**, v. 8, p. 46-56, 2018.

DAS GRAÇAS VAZ-TOSTES, M. et al. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 666-672, 2014.

DE SÁ, L. R. V. et al. Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International journal of hydrogen energy**, v. 36, n. 23, p. 15177-15186, 2011.

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

DIMIDI, E. et al. Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1806, 2019.

DOS REIS, SA et al. Kefir reduz a incidência de lesões pré-neoplásicas em um modelo animal para câncer colorretal. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 1-6, 2019.

DRABIŃSKA, N. et al. Daily oligofructose-enriched inulin intake impacts bone turnover markers but not the cytokine profile in pediatric patients with celiac disease on a gluten-free diet: Results of a randomised, placebo-controlled pilot study. **Bone**, v. 122, p. 184-192, 2019.

FARDELLONE, P. The effect of milk consumption on bone and fracture incidence, an update. **Aging Clinical and Experimental Research**, p. 1-6, 2019.

FERNÁNDEZ, E. C. et al. Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short-and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots. **LWT-Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 80-86, 2013.

FIORAMONTI, Jean; THEODOROU, Vassilia; BUENO, Lionel. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

FORTES, C. M T. et al. Relationship between chronological and bone ages and pubertal stage of breasts with bone biomarkers and bone mineral density in adolescents. **Jornal de pediatria**, v. 90, n. 6, p. 624-631, 2014.

FREI, R.; AKDIS, M.; O'MAHONY, L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. **Current opinion in gastroenterology**, v. 31, n. 2, p. 153-158, 2015.

GARCÍA-VIEYRA, M.I; DEL REAL, A.; LÓPEZ, M. G. Agave fructans: their effect on mineral absorption and bone mineral content. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 11, p. 1247-1255, 2014.

GAWARE, V. et al. The magic of kefir: a review. *Pharmacology online*, v. 1, p. 376-386, 2011.

GENDA, T. et al. The impact of fructo-oligosaccharides on gut permeability and inflammatory responses in the cecal mucosa quite differs between rats fed semi-purified and non-purified diets. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 64, n. 5, p. 357-366, 2018.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491, 2017..

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GOMES, J. C. *Análise de Alimentos*. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa 126p. 2011

GRANCIERI, M. et al. Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 666-675, 2017.

GRIMOUD, Julien et al. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. **Anaerobe**, v. 16, n. 5, p. 493-500, 2010.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506, 2014.

HIRA, T. et al. Resistant maltodextrin or fructooligosaccharides promotes GLP-1 production in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet, and partially reduces energy intake and adiposity. **European journal of nutrition**, v. 57, n. 3, p. 965-979, 2018.

HIROTA, Takako e HIROTA, Kenji. Nutritional Therapeutics: Bone Diseases. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, v. 2, p. 97-102, 2019.

HONORÉ, SM ; GENTA, S. B.; SANCHEZ, S. S. del V. *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves: an emerging source of compounds for diabetes management. 2015.

INSIGHTS, Global Market. Prebiotics market size by ingredient (inulin, GOS, FOS, MOS), by application (animal feed, food & beverages [dairy, cereals, baked goods, fermented meat, dry foods], dietary supplements [food, nutrition, infant formulations]), industry analysis report, regional outlook, application potential, price trends, competitive market share & forecast, 2017–2024 [Internet]. 2017. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/prebiotics-market>

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. p. 21-22. São Paulo: IMESP, 1985.

JALALI, F.; SHARIFI, M.; SALEHI, R. Kefir induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute erythroleukemia. **Medical Oncology**, v. 33, n. 1, p. 7, 2016.

JOHNSON-HENRY, K. C. et al. Short-chain fructo-oligosaccharide and inulin modulate inflammatory responses and microbial communities in Caco2-bbe cells and in a mouse model of intestinal injury. **The Journal of nutrition**, v. 144, n. 11, p. 1725-1733, 2014.

Junqueira, L. C. U., and L. M. M. S. Junqueira (eds.). 1983. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Santos, São Paulo.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotics in health and disease. **Annual review of food science and technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.

LEE, S.C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **J. Assoc. Off. Chem. Int.**, v. 75, p. 395-416, 1992.

LEE, Yuan Kun; SALMINEN, Seppo. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons, 2009.

LIU, Y. et al. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Calcium Homeostasis and Bone Health With Aging: A Systematic Review. **Worldviews on Evidence-Based Nursing**, v. 16, n. 6, p. 478-484, 2019

LOBO, A. R. et al. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 776-785, 2007.

MACHADO, A. M. et al. Consumption of yacon flour improves body composition and intestinal function in overweight adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical nutrition ESPEN*, v. 29, p. 22-29, 2019.

MAJUMDER, K.; MINE, Y.; WU, J. The potential of food protein-derived anti-inflammatory peptides against various chronic inflammatory diseases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 7, p. 2303-2311, 2016.

MARCIANO, R. et al. Effects of prebiotic supplementation on the expression of proteins regulating iron absorption in anaemic growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 6, p. 901-908, 2015.

MARCON, L. N. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-based product increases fecal short-chain fatty acids and enhances regulatory T cells by downregulating ROR γ t in the colon of BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 333-342, 2019.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.

MCCABE, L. R. et al. Probiotic use decreases intestinal inflammation and increases bone density in healthy male but not female mice. **Journal of cellular physiology**, v. 228, n. 8, p. 1793-1798, 2013.

MCCABE, Laura; BRITTON, Robert A.; PARAMESWARAN, Narayanan. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome. **Current osteoporosis reports**, v. 13, n. 6, p. 363-371, 2015.

MOHANTY, Debapriya et al. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food bioscience*, v. 26, p. 152-160, 2018.

MORA, Stefano. Celiac disease in children: impact on bone health. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 9, n. 2, p. 123-130, 2008.

NELKE, Christopher et al. Skeletal muscle as potential central link between sarcopenia and immune senescence. **EBio Medicine**, v. 49, p. 381-388, 2019.

OKOLIE, Chigozie Louis et al. Perspectivas de polissacarídeos de algas marrons (BSP) como prebióticos e potenciais imunomoduladores. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. e12392, 2017.

PABST, Oliver. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 12, p. 821-832, 2012.

PARIKH, Kaushal et al. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*, v. 567, n. 7746, p. 49-55, 2019.

PARK, Jin-Sil et al. Lactobacillus acidophilus improves intestinal inflammation in an acute colitis mouse model by regulation of Th17 and Treg cell balance and fibrosis development. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 3, p. 215-224, 2018.

PEREIRA, Fátima C.; BERRY, David. Microbial nutrient niches in the gut. *Environmental microbiology*, v. 19, n. 4, p. 1366-1378, 2017.

PEREIRA, Juciane Abreu Ribeiro et al. Total antioxidant activity of yacon tubers cultivated in Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 5, p. 596-605, 2016.

PRADO, Maria R. et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1177, 2015

PRAŽNIKAR, Z. Jenko et al. Effects of kefir or milk supplementation on zonulin in overweight subjects. **Journal of Dairy Science**, 2020.

QUACH, Darin; BRITTON, Robert A. Gut microbiota and bone health. In: *Understanding the Gut-Bone Signaling Axis*. Springer, Cham, 2017. p. 47-58.

RAJPUT, Richa; WAIRKAR, Sarika; GAUD, Ram. Nutraceuticals for better management of osteoporosis: An overview. **Journal of functional foods**, v. 47, p. 480-490, 2018.

REEVES, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for

ROBERFROID MB. Introducing inulin-type fructans. **Brazilian Journal of Nutrition**. 2005; 93(Suppl. 1):525-56.

RODRIGUES, Fabiana Carvalho et al. Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): produção e caracterização química. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (Impresso), v. 70, n. 3, p. 290-295, 2011.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANDERS, Mary Ellen. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SCHAAFSMA, Gertjan; SLAVIN, Joanne L. Significance of inulin fructans in the human diet. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 1, p. 37-47, 2015.

SCHEPPER, Jonathan D. et al. Probiotics in gut-bone signaling. In: *Understanding the gut-bone signaling axis*. Springer, Cham, 2017. p. 225-247.

SCHINKE, Thorsten et al. Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. **Nature medicine**, v. 15, n. 6, p. 674-681, 2009.

SCHOLZ-AHRENS, Katharina E. et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats—impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. **NFS journal**, v. 3, p. 41-50, 2016.

SCHOLZ-AHRENS, Katharina E. et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 3, p. 838S-846S, 2007.

SERGEEV, Igor N. et al. Effects of synbiotic supplement on human gut microbiota, body composition and weight loss in obesity. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 222, 2020.

SHARIFI, Mohammadreza et al. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology**, v. 34, n. 11, p. 183, 2017.

SLAVIN, Joanne. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-1435, 2013.

SUN, Yvonne; O'RIORDAN, Mary XD. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. In: Advances in applied microbiology. **Academic Press**, p. 93-118, 2013.

TANABE, Kenichi et al. Dietary Fructooligosaccharide and Glucomannan Alter Gut Microbiota and Improve Bone Metabolism in Senescence-Accelerated Mouse. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 3, p. 867-874, 2019.

TREMAROLI, Valentina; BÄCKHED, Fredrik. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242-249, 2012.

TU, Min-Yu et al. Kefir Peptides Prevent Estrogen Deficiency-Induced Bone Loss and Modulate the Structure of the Gut Microbiota in Ovariectomized Mice. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 3432, 2020.

TU, Min-Yu et al. Short-term effects of kefir-fermented milk consumption on bone mineral density and bone metabolism in a randomized clinical trial of osteoporotic patients. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. 4231, 2015.

TYAGI, Abdul Malik et al. The microbial metabolite butyrate stimulates bone formation via T regulatory cell-mediated regulation of WNT10B expression. **Immunity**, v. 49, n. 6, p. 1116-1131. E.7, 2018.

VAN DEN HEUVEL, Ellen GHM et al. Lactulose stimulates calcium absorption in postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 7, p. 1211-1216, 1999.

VASCONCELOS, C. M., et al.,. Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (Impresso), v. 69, n. 2, p. 188-193, 2010.

VILLA, C. R.; WARD, Wendy E.; COMELLI, Elena M. Gut microbiota-osso eixo. Revisões críticas em ciência e nutrição alimentar, v. 57, n. 8, p. 1664-1672, 2017.

WALSH, M. C. et al. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 3, p. 146-156, 2018.

WEISSTAUB, A. R. et al. Effects of the intake of white wheat bread added with garlic and resistant starch: action on calcium bioavailability and metabolic parameters of growing Wistar rats. **Food & function**, v. 9, n. 11, p. 5707-5714, 2018.

WHISNER, C. M.; CASTILLO, Luisa F. Probiotics, bone and mineral metabolism. **Calcified Tissue International**, v. 102, n. 4, p. 443-479, 2018.

YAMADA, T. et al. Daily intake of polyamine-rich *Saccharomyces cerevisiae* S631 prevents osteoclastic activation and bone loss in ovariectomized mice. **Food science and biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1241-1245, 2019.

YAN, M. R. et al. A Sustainable Wholesome Foodstuff; Health Effects and Potential Dietotherapy Applications of Yacon. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2632, 2019.

ZOCH, M.L.; CLEMENS, T. L.; RIDDLE, R. C. New insights into the biology of osteocalcin. **Bone**, v. 82, p. 42-49, 2016.

ANEXO

ANEXO 1 - Certificado: Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA



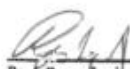
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do Consumo Preventivo com frutooligossacarídeos derivados do Yacon na Barreira Intestinal, resposta inflamatória e estresse oxidativo em modelo animal de câncer de cólon", Protocolo nº.17/2016, sob a responsabilidade de Mirele Lomar Viana que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.399, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e foi aprovado "ad referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 05-08-2016.

Vigência do Projeto	Início: Agosto/2016 Término: Agosto/2018
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	Experimento Piloto:0 Protocolo Experimental:40 Total:40
Peso/Idade	Peso: entre 300-450g Idade:Adulto
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 05 de agosto de 2016.


Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES