

# FERMENTAÇÃO DE MATRIZES VEGETAIS PELO KEFIR AUMENTA PODER ANTIOXIDANTE DO PRODUTO FINAL

Filipe Martins\*

Tadeu de Andrade\*\*

## RESUMO

O aumento da expectativa de vida em todo o mundo tem elevado a prevalência de doenças crônicas e progressivas, como as cardiovasculares (DCV), que representam a terceira maior causa de mortalidade global. Visto que existe uma relação entre DCV, envelhecimento e estresse oxidativo, o uso de antioxidantes exógenos pode se tornar uma abordagem promissora para prevenção e tratamento dessas condições. O presente estudo objetivou comparar três bebidas fermentadas com kefir, preparadas a partir dos substratos de soja, cacau ou yacon, quanto à sua atividade antioxidante *in vitro* e no organismo modelo *C. elegans*. Foram realizadas análises de polifenóis, flavonoides, microbiologia, atividade antioxidante e desenvolvimento e mortalidade no organismo modelo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos ao teste t nas análises de comparação das bebidas não fermentadas com suas respectivas matrizes fermentadas e à análise de variância de uma via (ANOVA) nos experimentos com nematoides. A significância da diferença entre as médias foi determinada por teste *post-hoc* de Tukey, ajustado para múltiplas comparações, com significância aceita acima de 5%. As bebidas fermentadas de yacon e cacau apresentaram aumento nos teores polifenóis totais, enquanto a de soja exibiu maior concentração de flavonoides. Os testes realizados no *C. elegans* indicam ausência de toxicidade em todas as bebidas fermentadas. Dessa forma, conclui-se que todas as bebidas fermentadas com grão de kefir realizadas no presente estudo apresentam ótima atividade antioxidante, avaliada pelo teste de ABTS, e são seguras para consumo, destacando o seu uso como potenciais alimentos funcionais.

**Palavras-chave:** kefir; bebida fermentada; soja; cacau; yacon.

\* Discente do Curso de Farmácia, Universidade Vila Velha, ES, Brasil.

\*\* Docente do Curso de Farmácia; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Vila Velha, ES, Brasil

## ABSTRACT

The increase in life expectancy worldwide has led to a higher prevalence of chronic and progressive diseases, such as cardiovascular diseases (CVD), which represent the third leading cause of global mortality. Considering the relationship between CVD, aging, and oxidative stress, the use of exogenous antioxidants may become a promising approach for preventing and treating these conditions. This study aimed to compare three kefir-fermented beverages, prepared from soybean, cocoa, or yacon substrates, regarding their antioxidant activity *in vivo* and in the model organism *C. elegans*. Analyses of polyphenols, flavonoids, microbiology, antioxidant activity, and development and mortality in the model organism were conducted. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM and subjected to the *t*-test for comparisons between non-fermented beverages and their respective fermented matrices, as well as one-way analysis of variance (ANOVA) in the experiments with nematodes. The significance of differences between means was determined using Tukey's post-hoc test, adjusted for multiple comparisons, with significance accepted above 5%. Yacon and cocoa fermented beverages showed an increase in total polyphenols, while the soybean fermented beverage exhibited higher flavonoid concentrations. Tests performed on *C. elegans* indicate the absence of toxicity in all fermented beverages. Thus, it is concluded that all kefir-fermented beverages produced in this study present excellent antioxidant activity, evaluated by the ABTS test, and are safe for consumption, highlighting their potential use as functional foods.

**Keywords:** kefir, fermented beverage, soy, cocoa, yacon.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os avanços médicos e tecnológicos causaram um aumento na expectativa de vida global. O processo de envelhecimento é progressivo, complexo e caracterizado por uma série de mudanças fisiológicas relacionadas a degeneração celular e molecular, diminuindo a capacidade do organismo de se adaptar e resistir ao estresse metabólico. Dessa forma, o estresse oxidativo e a inflamação crônica são os principais fatores envolvidos no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças crônicas (LEYANE; JERE; HOURELD, 2022).

Diversos processos que participam do metabolismo celular normal do organismo, como a digestão de alimentos, respiração e metabolismo de medicações, além de fatores genéticos e ambientais, desencadeiam a formação de radicais livres. Em condições normais, esses radicais são neutralizados por mecanismos antioxidantes endógenos, mantendo a homeostasia oxidativa (LEYANE; JERE; HOURELD, 2022).

Apesar disso, alguns processos como o envelhecimento e inflamação podem causar um aumento na produção desses radicais, ocasionando um desequilíbrio entre a quantidade de radicais livres produzidos e a capacidade do organismo de neutralizá-los, ocasionando o estresse oxidativo (EO) (JENA *et al.*, 2023; JIANG *et al.*, 2023).

Nesse contexto, o uso de antioxidantes exógenos pode se tornar uma metodologia viável para a prevenção e tratamento de pacientes que apresentam o desenvolvimento do EO (SHENG *et al.*, 2023). Dentre os antioxidantes exógenos, os alimentos funcionais têm ganhado grande destaque, visto que eles são alimentos que, quando regularmente consumidos, apresentam um potencial efeito positivo na saúde, além da questão nutricional (ESSA *et al.*, 2021).

Dentre os alimentos funcionais, pode-se citar os probióticos, que são microrganismos não patogênicos que, em determinadas doses, causam benefícios a saúde, por regular a microbiota e participar do metabolismo, dentre os quais se destaca o kefir (CUFAOGLU; ERDINC, 2023). O kefir é uma bebida fermentada rica em bactérias e leveduras benéficas que apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenos, sendo que ele pode ser produzido a base de leite, água ou outros substratos, permitindo uma grande diversificação nas bactérias e leveduras presentes (AZIZI *et al.*, 2021).

Entre os diversos substratos que podem ser utilizados, aqueles que naturalmente apresentam efeitos benéficos à saúde são considerados bons pontos de partida, dentre eles, pode-se citar o leite de soja e o leite de cacau, sendo ambos alternativas populares ao leite de vaca, além de conter quantidades significativas de flavonoides e polifenóis, apresentando atividade antioxidante. Ademais, o suco de yacon também se torna uma opção valiosa, devido a sua alta quantidade de polifenóis e fibras, além de atuar como prebiótico (AMOAH *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2021; DE SOUZA *et al.*, 2024).

Organismos modelo têm sido amplamente utilizados com o intuito de melhor compreender os mecanismos antioxidantes e a aplicabilidade de produtos de origem natural. Dentre esses modelos, tem-se o *Caenorhabditis elegans*, um nematoide amplamente utilizado em pesquisas relacionadas a antioxidantes e antienvhecimento, devido ao seu baixo custo, fácil manutenção e pequeno ciclo de vida. Sua utilização em pesquisas relacionadas a antioxidantes se dá devido a presença de enzimas e isoenzimas comparáveis aos dos humanos, além da fácil absorção de substâncias (LIN *et al.*, 2023).

Por tanto, a partir do que foi apresentado, acredita-se que bebidas fermentadas à base de kefir, tendo a soja, o cacau ou o yacon como substratos, pode ser capaz de reduzir o EO e, conseqüentemente, ser utilizadas no tratamento ou prevenção de doenças crônicas e progressivas desencadeadas ou estimuladas pelo EO.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas do oxigênio (ERO) são radicais livres derivados do oxigênio que apresentam grande importância no processo de diferenciação e proliferação celular, apoptose, necrose e regulação de fatores de transcrição (JOMOVA *et al.*, 2023).

De acordo com Masenga *et al.* (2023) as duas principais fontes de ERO intracelular é a enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase (NOX) e a mitocôndria. A mitocôndria forma radicais livres durante a fosforilação oxidativa, ao reduzir NADH em  $\text{NAD}^+$ , enquanto o NOX, em especial o NOX-2, realiza esse processo ao reduzir o oxigênio, utilizando NADPH como cofator. Apesar de serem processos diferentes, ambos dão origem ao ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (RAJLIC *et al.*, 2023).

Nesse contexto, de modo a manter a homeostasia oxidativa, o organismo faz uso de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para neutralizar os radicais livres gerados, sendo as enzimas mais importantes a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GPX). (BATTY; BENNETT; YU, 2022; GIANAZZA *et al.*, 2021). Com isso em mente, o  $\text{O}_2^-$  gerado a partir da mitocôndria e do NOX é extremamente reativo e instável, sofrendo dismutação pelas enzimas SOD2, presente na matriz mitocondrial, e SOD1, presente na intermembrana mitocondrial, dando origem ao peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (BATTY; BENNETT; YU, 2022; GIANAZZA *et al.*, 2021).

Apesar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  não ser reativo o suficiente para causar danos, ele é capaz de atravessar membranas biológicas, interagir com íons de metais de transição, e dar origem ao radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), sendo esse altamente reativo com lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos. Dessa forma, a catalase e a GPX convertem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ), sendo ambos utilizados novamente no processo de respiração celular (BATTY; BENNETT; YU, 2022; GIANAZZA *et al.*, 2021).

Contudo, quando ocorre um desequilíbrio entre a formação e a neutralização dessas espécies reativas pelos antioxidantes, dá-se origem ao estresse oxidativo (EO) (JOMOVA *et al.*, 2023).

Dessa forma, o EO é um processo patológico que pode desencadear danos ao DNA, aumentar a inflamação celular, promover a peroxidação de membranas lipídicas e ocasionar a disfunção mitocondrial, estando associado ao desenvolvimento de diversas patologias neurodegenerativas, cardiovasculares e tumorais. (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; KLRAN; OTLU; KARABULUT, 2023).

O estudo de Rajlic *et al.* (2023) corrobora com esses dados, ao identificar que o estresse oxidativo tem grande relação com a patogênese da diabetes mellitus (DM), através da estimulação de processos apoptóticos que levam a morte das células- $\beta$  pancreáticas, obstrução de fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes relacionados a insulina e redução da neogênese de células- $\beta$ . Ademais, o aumento da glicose sérica na DM estimula a produção de ERO pelas mitocôndrias e por macrófagos, desencadeando danos ao DNA e modificações proteicas e lipídicas, causando o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV).

As DCV são a principal causa de morte globalmente, apresentando um desenvolvimento multifatorial. Apesar disso, o EO participa ativamente no seu processo de patogênese, causando disfunção e danos endoteliais, inflamação vascular e a geração de LDL oxidado nas artérias, desencadeando a formação da aterosclerose, hipertensão e hipertrofia cardíaca. Ademais, a disfunção mitocondrial gerada pelo aumento de glicose sérica na DM ou pelo EO causado por outros meios, como o NOX, induz a apoptose de cardiomiócitos (COJOCARU *et al.* 2023).

A partir disso, o uso de antioxidantes exógenos que sejam capazes de reestabelecer a homeostasia se torna essencial. Os polifenóis são um exemplo dessas moléculas, estando

naturalmente presentes em diversas plantas e apresentando uma vasta quantidade de efeitos no organismo. Contudo, eles são principalmente utilizados devido a sua capacidade de neutralizar radicais livres e regular vias de sinalização antioxidantes (LI *et al.*, 2023; YAN *et al.*, 2023).

Dentre essas vias de sinalização, o fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2 (Nrf-2) é um regulador de sistemas antioxidantes que atua por meio da regulação da biossíntese, utilização e regeneração de mais de 250 enzimas antioxidantes como SOD, catalase e GPX, além de modular a produção mitocondrial das ERO e da atividade da NADPH. (ALONSO-PIÑEIRO *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2022).

Dessa forma, o estudo de possíveis alimentos ricos em polifenóis e outras moléculas antioxidantes que possam ser administrados a pacientes para prevenção ou tratamento de patologias relacionadas ao estresse oxidativo se torna essencial.

## 2.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Em 1999, os alimentos funcionais foram definidos pelo European Commission on Functional Food Science in Europe (FU.FO.S.E), como alimentos que, além do seu valor nutricional, são capazes de reduzir o risco de doenças e promover o bem-estar e a melhora da saúde. Atualmente, esses alimentos são classificados em alimentos convencionalmente utilizados, alimentos modificados e prebióticos. Os alimentos convencionalmente utilizados são aqueles que não sofreram nenhuma modificação, como vegetais, peixes e grãos, enquanto os alimentos modificados ou fortificados são aqueles enriquecidos com cálcio, folato, ômega-3 e outros micronutrientes de modo a suprir a sua falta (ESSA *et al.*, 2023; GIUFFRÈ; GIUFFRÈ, 2024).

A fortificação dos alimentos foi implementada de forma obrigatória em 143 países, abrangendo os alimentos mais consumidos por determinadas populações. De modo que o alimento fortificado ofereça seus benefícios, é necessário que o produto final contenha pelo menos 15% do valor de referência de nutrientes (VRN) por 100 g ou 100 ml no caso de produtos não líquidos, ou 7,5% no caso de bebidas (PIMENTA-MARTINS *et al.*, 2024). Entre os exemplos mais comuns de alimentos fortificados, as fórmulas infantis, especialmente as enriquecidas com ferro, apresentaram melhora dos parâmetros sanguíneos e até mesmo contribuição na desparasitação de crianças infectadas por parasitas (COZER *et al.*, 2024).

Por outro lado, os prebióticos são alimentos, ingredientes ou substratos não-digestíveis que seletivamente estimulam o crescimento ou atividade de certas bactérias que compõem a microbiota, melhorando a saúde do organismo. Esses prebióticos não necessariamente devem ser administrados oralmente, podendo ser administrados diretamente em outros locais colonizados por bactérias, como o canal vaginal e a pele (BEVILACQUA *et al.*, 2024).

Apesar disso, a maior parte destes prebióticos é utilizado oralmente, com o intuito de regular a microbiota intestinal, sendo a inulina e a oligofrutose os mais presentes. A oligofrutose, por exemplo, é fermentada no intestino, dando origem a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido butírico, ácido acético e ácido propiônico, sendo esses, produtos de fermentação que apresentam diversos efeitos na saúde, como melhora cognitiva, imunomodulação, redução dos níveis séricos de lipídeos, aumento de biodisponibilidade mineral e atividade antioxidante (BEVILACQUA *et al.*, 2024; ESSA *et al.*, 2023).

Baker *et al.* (2022) concluem em seus estudos que o interesse do público quanto a inserção de alimentos funcionais na dieta e a demanda por esses alimentos tem aumentado significativamente. Existem diversos fatores que influenciam severamente nessa aceitação, estando não somente relacionadas ao produto, mas também nas características psicológicas, físicas, sócio-demográficas e comportamentais do comprador.

Outra classe de alimentos funcionais que tem ganhado atenção são os probióticos, microrganismos não-patogênicos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas,

conferem benefícios à saúde. Dentre esses microrganismos, os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais utilizados, podendo ser incorporados em alimentos, como o kimchi, ou em bebidas, como o kefir, sendo o consumo de, aproximadamente,  $10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC)/dia necessário para que haja os seus efeitos. Diversos estudos já comprovaram os efeitos benéficos da incorporação de probióticos na dieta, como prevenção de bactérias patogênicas, modulação da microbiota intestinal, aumento da biodisponibilidade de micro e macronutrientes, atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (FIJAN, 2023; LATIF *et al.*, 2023; ROE *et al.*, 2022).

### 2.3 KEFIR

O kefir é uma bebida fermentada e naturalmente gaseificada, com pH ácido (cerca de 4,5) e baixo teor alcoólico. Ela é produzida através da fermentação de diferentes substratos utilizando uma matriz conhecida popularmente como “grão de kefir”, que é composta por uma combinação de bactérias e leveduras. Os substratos para a produção do kefir podem ser leite animal, água e açúcar, água de coco, suco de romã, suco de uva, entre outros, podendo ser uma alternativa viável para pessoas que apresentam intolerância à lactose (DE SOUZA *et al.*, 2024).

Os grãos de kefir (Figura 3) são pequenos e de formato irregular, apresentando composição microbiológica variada, sendo essa variação ocasionada por diversos fatores, como o tipo de substrato e as condições de fermentação. Contudo, os principais microrganismos presentes são leveduras, bactérias do ácido acético (BAA) e bactérias ácido-lácticas (BAL), tendo *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.* e *Acetobacter sp.* como principais representantes. Já as espécies de leveduras mais encontradas são o *Saccharomyces sp.*, *Candida kefir* e *Kluyveromyces sp.* (SALEEM *et al.*, 2023; SOUZA *et al.*, 2024).



**Figura 3:** Comparação entre o kefir de leite e de água (SALEEM *et al.*, 2023)

O processo de fermentação do kefir é ocasionado pelas BAL, por meio da homofermentação, que converte glicose em ácido láctico, e da heterofermentação, que produz ácido acético, ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Por outro lado, as leveduras convertem glicose em etanol e dióxido de carbono, enquanto as BAA oxidam o etanol gerado, tanto pelas BAL quanto pelas leveduras, por meio da fermentação acética, resultando em ácido acético (GIUFFRÈ; GIUFFRÈ, 2024).

Dessa forma, o kefir é capaz de prevenir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos no substrato em que são fermentados, devido ao pH ácido da solução e a produção de peptídeos antimicrobianos e ácidos orgânicos. Essa capacidade antimicrobiana também está

presente *in vivo*, onde o kefir é capaz de prevenir a aderência de bactérias patogênicas no intestino ao competir pelos sítios de ligação, estimular a imunomodulação e promover a integridade da mucosa intestinal (LATIF *et al.*, 2023; SALEEM *et al.*, 2023;).

Diversos estudos já elucidaram os efeitos benéficos do kefir, principalmente os relacionados a fatores de risco cardiovascular, como a redução hepática e sérica de TGR, colesterol total e LDL, além de reduzir a expressão de genes relacionados a adipogênese, lipogênese e citocinas pró-inflamatórias. A redução de outros parâmetros, como os relacionados a diabetes mellitus e a hipertensão também foram demonstrados, sendo essa diminuição causada pela redução da glicose sérica, da relação TNF- $\alpha$ /IL-10, da resistência à insulina e da hipertrofia cardíaca, tornando o kefir um alimento funcional com vastas aplicações (APALOWO *et al.*, 2024; CULPEPPER, 2022; EGEA *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o kefir é capaz de restringir ou até mesmo prevenir o desenvolvimento da placa aterosclerótica, por meio da sua capacidade de reduzir certos parâmetros indutores, como LDL, moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) e citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-17a (APALOWO *et al.*, 2024; HIJOVÁ, 2023). Ademais, o kefir apresenta uma marcante atividade antioxidante, atuando direta ou indiretamente na neutralização de EROs. Essa atividade apresenta várias origens, incluindo o substrato fermentado (como sucos, leites, frutas), o exopolissacarídeo da matriz do kefir, os produtos gerados pela fermentação e as alterações na atividade enzimática do organismo, seja por regulação ou estimulação de enzimas antioxidantes (COUTO *et al.*, 2023; EGEA *et al.*, 2022; GENTRY; CAZÓN; O'BRIEN, 2023; SEO *et al.*, 2022).

O kefirano é um exopolissacarídeo hidrossolúvel e ramificado composto por quantidades iguais de galactose e glicose, sendo um dos componentes primários dos grãos de kefir. Ele é secretado por BAL do gênero *Lactobacillus*, em especial *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir* e *Lactobacillus kefir*. Estruturalmente, o kefirano atua como uma forma de proteção aos grãos, sendo também responsável por conferir a textura característica ao produto fermentado. Diversas pesquisas apontam que esse exopolissacarídeo apresenta efeitos na saúde, como imunomodulador, antioxidante, redutor de pressão arterial e anti-inflamatório (COUTO *et al.*, 2023; CULPEPPER, 2022; GENTRY; CAZÓN; O'BRIEN, 2023; LIAO *et al.*, 2023).

Atualmente, muitos estudos estão se direcionando a matrizes vegetais, sendo essas de grande importância devido a crescente necessidade de alimentos veganos, seja por questões pessoais ou devido a intolerâncias. Um desses substratos é a soja, pelo qual o kefir é capaz hidrolisar suas proteínas em aminoácidos, pequenos peptídeos e análogos de peptídeos bioativos, enquanto as saponinas e os flavonoides glicosilados são hidrolisados em suas respectivas agliconas, garantindo um alto teor antioxidante e alta capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina-1 (ECA), tendo como um dos seus efeitos a redução da pressão sanguínea e o melhor controle de crises hipertensivas (AZI *et al.*, 2021).

Assim, o estudo aprofundado de outros substratos, principalmente os de origem vegetal, com o intuito de potencializar os seus efeitos antioxidantes, anticancerígenos, anti-hipertensivos ou antilipêmicos, é uma abordagem essencial de ser realizada, de modo a descobrir novos substratos e efeitos resultantes da fermentação.

## 2.4 SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta herbácea da família *Fabaceae*, originária da Ásia, especificamente da China. Sua introdução no Brasil ocorreu no ano de 1901, quando começaram os cultivos na Estação Agropecuária de Campinas e a distribuição de sementes para os agricultores paulistas, com sua expansão nos anos 1970, quando a indústria de óleo começa

a ser expandida e devido ao aumento da demanda internacional. Posterior a 2005, foi regulamentada definitivamente o plantio e comercialização de espécies transgênicas no Brasil, aumentando ainda mais sua produção (APROSOJA BRASIL, 2023; EMBRAPA, 2021).

De acordo com os levantamentos da safra 2023/2024, realizados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), foram produzidos 395.91 milhões de toneladas de soja no mundo. Desse total, 147.35 milhões de toneladas (cerca de 37,21%) foram produzidos pelo Brasil, enquanto 113.34 milhões de toneladas (cerca de 28,62%) foram produzidos pelos Estados Unidos. Ademais, conforme dados disponibilizados pelo Ministério da Economia, em 2023, o Brasil produziu 209.363 milhões de toneladas de soja, sendo 126.677 milhões de toneladas exportadas, gerando uma receita de \$67.914 milhões, comprovando a importância deste grão para a economia brasileira.

A soja apresenta diversos macro e micronutrientes, como proteínas, fibras, gorduras, carboidratos simples, potássio, sódio, cálcio, ferro, magnésio e isoflavonas. Dentre os seus componentes, as proteínas presentes na soja são de extrema importância, principalmente devido ao seu escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) de 1.0, indicando ser próxima de proteínas de origem animal, além de conter uma grande gama de aminoácidos essenciais (DAVY; VUONG, 2022; QIN; WANG; LUO, 2022).

Contudo, diversos estudos se voltam para a análise da isoflavona presente na soja. A isoflavona é um flavonoide produzido principalmente pelas plantas da família *Fabaceae* que apresenta diversas propriedades no organismo, como antioxidante, antienvhecimento, anti-inflamatória, antibactericida e anticancerígena (CHEN *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2022).

Apesar disso, os potenciais efeitos da isoflavona são dependentes, em grande parte, da forma bioativa em que ela foi transformada por meio da microbiota intestinal. De acordo com um estudo realizado por Langa *et al.* (2023), algumas espécies de lactobacilos são capazes de transformar as formas metiladas e glicosiladas das isoflavonas em agliconas, que apresentam maior biodisponibilidade, sendo que essas agliconas podem ser transformadas em compostos com uma atividade biológica ainda maior, como a o-desmetilangolensina (O-DMA), dihidrogenisteína (DHG) e a dihidrodaidzeína (DHD).

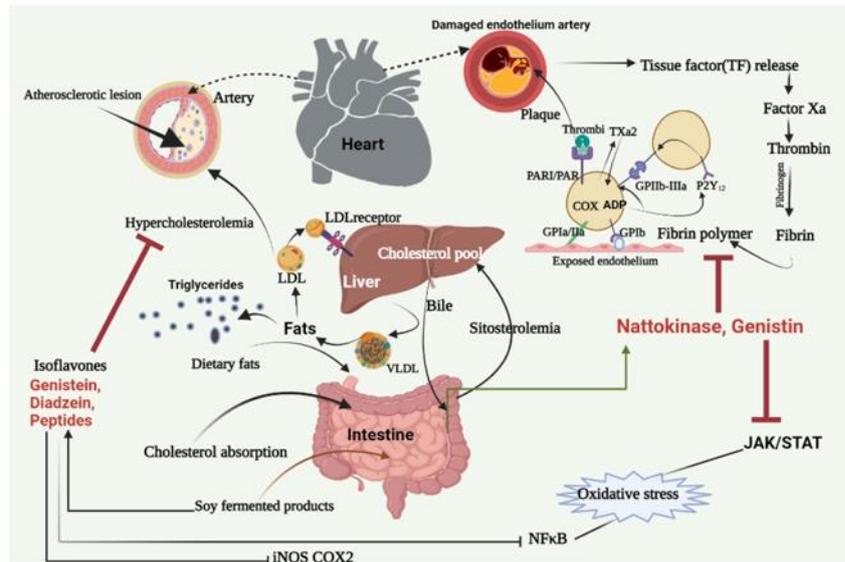
Dessa forma, o processo de fermentação está associado ao metabolismo e biotransformação de componentes presentes na soja. Prado *et al.* (2022) concluem em seu estudo que as agliconas genisteína e daidzeína, estão presentes em maior quantidade posterior a fermentação, sendo ambas responsáveis por efeitos antioxidantes.

Em modelos animais, um estudo demonstrou que o leite de soja fermentado com kefir, quando utilizado por ratos wistar pós treino aeróbico, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica e a formação de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) e aumentar a atividade de SOD, indicando redução do estresse oxidativo gerado pelo músculo esquelético durante treinamento, sendo também responsável pela redução da fadiga apresentada pelos ratos (GOMES *et al.*, 2021).

Azizi *et al.* (2021) ao administrarem uma bebida fermentada de leite de soja a ratos submetidos a uma dieta hipercalórica, identificaram inibição da atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase intestinal e pancreática em 26 e 31%, respectivamente, reduzindo a glicose sérica em 36%, demonstrando o seu potencial uso na diabetes mellitus ou na hiperglicemia.

Ademais, estudos indicam que a genisteína (Figura 4) produzida posterior a fermentação da soja reduz significativamente os níveis séricos de TGR, LDL e pressão sistólica, sendo que a administração por mais de 6 meses apresenta um maior efeito na redução do colesterol e da pressão sistólica e diastólica (AMERIZADEH *et al.*, 2024). A genisteína também é capaz de aumentar o substrato do receptor de insulina (IRS) 1, a quinase N-terminal c-JUN e o transportador de glicose (GLUT), além de estimular a SOD, reduzir danos mitocondriais e peroxidação lipídica, influenciando positivamente na redução dos fatores de risco relacionados a DCV (DWIVEDI *et al.*, 2024).

Por outro lado, a daidzeína, também produzida posterior a fermentação, estimula os IRS1 e GLUT4 nos adipócitos, aumentando a absorção de glicose em resposta a insulina (DWIVEDI *et al.*, 2024).



**Figura 4:** Influência dos bioativos de produtos de soja fermentados nas DCV (DWIVEDI *et al.*, 2024)

## 2.5 BATATA YACON

A batata yacon (Figura 5) (*Smallanthus sonchifolius*) é uma planta perene da família *Asteraceae*, originária da Cordilheira dos Andes. Diferentemente de outros tubérculos, a yacon armazena os carboidratos na forma de frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, sendo ambos polissacarídeos não-digeridos pelo organismo, atuando como fibras e, com maior importância, como prebióticos, além de ser rica em polifenóis, fitoalexinas e ácidos fenólicos, apresentando atividade antioxidante (ELSHAGHABEE; ROKANA, 2022; MARQUES *et al.*, 2024).



**Figura 5:** Batata yacon (CABI, 2022)

Os prebióticos são carboidratos não-digeríveis que atuam como substrato para as bactérias presentes no intestino, estimulando seu crescimento ou metabolismo. Dessa forma, os prebióticos presentes na yacon apresentam diversos efeitos fisiológicos, como a melhora da absorção de minerais, diminuição do colesterol, TGR e fosfolípidos, estímulo do sistema imune e redução do risco de DCV (SALES *et al.*, 2023; YOU *et al.*, 2022).

You *et al.* (2022) identificam em seu estudo que o uso de prebióticos associado a probióticos é uma estratégia que pode aumentar a efetividade do probiótico ao aumentar o número de bactérias presentes. Ademais, o grau de polimerização e dosagem do prebiótico está

fortemente relacionado com a atividade do probiótico, sendo observado um aumento maior no número de *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium sp.* no grupo que utilizou FOS quando comparado ao grupo que utilizou inulina. Contudo, a atividade e efeitos da inulina estão fortemente relacionados ao seu grau de polimerização (GP), sendo a inulina de baixo GP mais eficaz do que a de alto GP.

Nesse contexto, Li e colaboradores (2024), ao utilizar camundongos submetidos a uma dieta rica em gorduras, concluíram que a inulina foi capaz de reduzir os níveis séricos de lipídeos, incluindo colesterol, TGR e LDL, por meio da redução da síntese de lipídeos, redução da absorção intestinal e melhora da microbiota. Ademais, a inulina foi capaz de reverter o declínio da L-arginina, sendo ela substrato e precursora na síntese de óxido nítrico e, por reduzir a expressão de endotelina-1, atua como antioxidante e regula a permeabilidade endotelial, apresentando atividade antiaterosclerótica.

Em relação aos FOS, Nobre *et al.* (2021) concluíram que esses prebióticos estão relacionados a diversos benefícios como a redução do risco de osteoporose, câncer e DCV, estímulo do sistema imune, melhor resposta a crises alérgicas e diminuição dos sintomas relacionados a doença de Crohn e a síndrome do intestino irritável. O estudo de Gomes *et al.* (2023), que administrou uma bebida fermentada de yacon em ratos, indica que a yacon, sendo uma fonte de FOS, é benéfica no tratamento da obesidade, ao reduzir a ingestão de alimentos, ganho de peso e adiposidade. Ademais, a fermentação do FOS pela microbiota está associada a uma maior biodisponibilidade de minerais no intestino, especialmente do  $Ca^{2+}$ , por meio da redução do pH intraluminal e do efeito osmótico da inulina.

Dessa forma, a yacon se torna um possível substrato para a fermentação. Peng e colaboradores (2022), ao fermentar o xarope de yacon com *Lactiplantibacillus plantarum*, concluíram que o processo de fermentação aumenta a atividade antioxidante e, possivelmente, garante a capacidade de inibir a  $\alpha$ -amilase e a  $\alpha$ -glicosidase, estando essa inibição relacionada ao 4-hexiloxifenol formado pós-fermentação. Tanto a  $\alpha$ -amilase quanto a  $\alpha$ -glicosidase estão relacionadas ao processo de metabolismo dos carboidratos, sendo responsáveis pela hidrólise do amido e da glicose, respectivamente, sendo os inibidores dessas enzimas usados de modo a modular a hiperglicemia pós-prandial (CISNEROS-YUPANQUI *et al.*, 2023).

Cruz *et al.* (2021) ao administrar uma bebida probiótica utilizando o yacon como substrato, concluíram que a fermentação do FOS e da inulina presente na batata libera metabólitos, como o butirato e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que estimulam a proliferação de células saudáveis. Além disso, esse mesmo estudo demonstra que houve redução de TNF, aumento de IL-2 e IL-4, redução da permeabilidade intestinal e do estresse oxidativo, sendo esses efeitos atribuídos a presença de flavonoides, compostos fenólicos, AGCC produzidos pós fermentação e da atividade do probiótico no organismo.

## 2.6 CACAU

O cacaueteiro (Figura 6) (*Theobroma cacao*) é uma árvore de pequeno porte da família *Malvaceae*, nativa das florestas tropicais das Américas Central e do Sul, que tem o cacau como fruto. No Brasil, o cultivo ocorre nas regiões Norte e Nordeste, lentamente se expandindo para as regiões Sudeste e Centro Oeste, sendo 95% da produção nacional realizada na Bahia e no Pará (BRASIL, 2024; UFRJ, 2024).

Economicamente, o cacau apresenta grande importância ao Brasil, ocupando, em 2020, a posição de 6º maior produtor mundial. Em 2022, o Brasil exportou 84 mil toneladas de cacau, sendo 36 mil toneladas de chocolate e 48 mil toneladas de derivados do cacau, arrecadando \$340 milhões de dólares. Por outro lado, em 2023, o Brasil produziu 296.145 mil toneladas de cacau, com um valor de produção de R\$ 4.63 bilhões, novamente demonstrando a sua importância na economia nacional (BRASIL, 2022; IBGE; 2023).



**Figura 6:** Árvore, fruto e flor do cacaueiro (UFRJ, 2024)

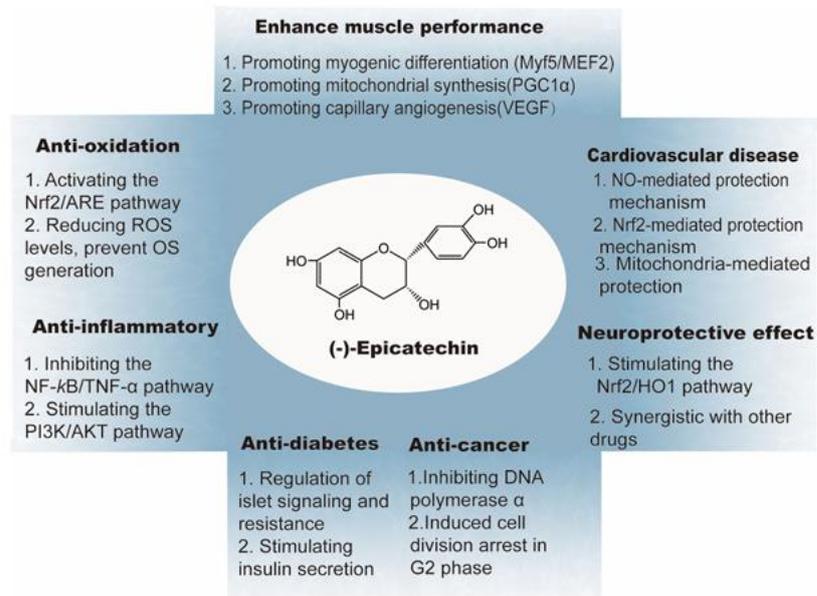
O cacau, ao longo da história, foi utilizado como alimento, bebida sagrada e moeda de troca, apresentando grande importância para os povos amazônicos, de onde é originário. Apesar disso, atualmente a maior parte do cacau é utilizado na produção de chocolate, com fins econômicos. Contudo, desde as Grandes Navegações, esse fruto já era estudado quanto as suas propriedades medicinais, tendo sua primeira menção realizada na *Memoria I sobre o cacau*, de Roseier, que cita o uso do óleo ou manteiga de cacau no tratamento de hemorroidas e no uso dermatológico (FREITAS; PIRANI; COLLI-SILVA, 2023; MOISÉS, 2023).

Com isto em mente, diversos estudos atualmente se voltam para as aplicações medicinais do fruto, principalmente aquelas relacionadas aos antioxidantes e antienvhecimento. Dos constituintes presentes nos grãos de cacau, cerca de 12 a 18% são compostos por polifenóis, especialmente flavonoides, sendo predominantemente representados pela epicatequina. Apesar disso, outros fitocompostos também foram detectados nesses grãos, como a teobromina, catequina, ácido cafeico e derivados da epicatequina (RAMOS-ESCUADERO *et al.*, 2021).

Destes, a teobromina é uma metilxantina presente em alguns outros frutos, como o guaraná e a noz-de-cola, com o cacau apresentando cerca de 3.3% desse alcaloide, estando em maior quantidade na pasta torrada e moída. Diversos estudos apontam que a teobromina atua como um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina, sendo esses receptores relacionados a patogênese de diversas doenças, incluindo a diabetes mellitus tipo II, DCV e condições neurológicas. Ademais, ela também atua como inibidor da enzima poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), podendo essa propriedade estar relacionada com a ação imunomoduladora da teobromina, visto que ela apresenta atividade anti-inflamatória em diversos tipos celulares, como macrófagos e condrócitos (ZHANG *et al.*, 2024).

Em relação a epicatequina (Figura 7), muitos estudos indicam que parte dos benefícios gerados pela ingestão do cacau e do chocolate estão relacionados as suas atividades. A partir de estudos clínicos, a administração oral de epicatequina está associada a redução de fatores de risco para DCV, como a redução de TGR em pacientes que apresentam hipertrigliceridemia e a redução da hiperglicemia pós-prandial em pacientes obesos (HID *et al.*, 2022, QU *et al.*, 2022).

O estudo de Dicks *et al.* (2022) corrobora com os estudos previamente citados. De acordo com o seu estudo, a epicatequina reduz a inflamação e o EO presente nos tecidos e aumenta a secreção de insulina e incretinas, atuando no controle da hiperglicemia. Ademais, ela modula a expressão de fatores de transcrição relacionados a síntese de TGR e colesterol, e ativa a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), aumentando as taxas de  $\beta$ -oxidação, estimulando o catabolismo de lipídeos e glicose (HID *et al.*, 2022).



**Figura 7:** Principais efeitos fisiológicos gerados pela epicatequina (QU *et al.*, 2022)

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Para o preparo das bebidas fermentadas, os grãos de kefir utilizados foram gentilmente cedidos pela professora Célia L. L. F. Ferreira da Universidade Federal de Viçosa – UFV, a soja e a batata yacon foram adquiridos *in natura* em estabelecimentos comerciais da Grande Vitória e as sementes de cacau secas e torradas foram fornecidas pela INCAPER-ES.

#### 3.2 PREPARO DAS BEBIDAS FERMENTADAS

As bebidas fermentadas de soja, yacon e cacau foram feitas de acordo com os delineamentos experimentais de Box-Behnken de Heringer (2020), Moraes (2020) e Kalil (2021), respectivamente.

##### 3.2.1 Soja

A bebida fermentada de soja foi preparada utilizando o grão de soja inteiro, seco e maduro. Um quilograma desses grãos foi encharcado em água destilada e mantido em temperatura ambiente por 8h, havendo troca da água a cada 2h.

Para o preparo da bebida fermentada, utilizou-se uma concentração de 20% de leite de soja e 6% de grãos de kefir. A fermentação foi realizada por 24h a 25°C em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand, TECNAL TE-391, SP, Brasil), definido a partir de testes preliminares. Em seguida, os grãos foram retirados e o filtrado resultante foi refrigerado (aproximadamente 5°C) por mais 24h.

##### 3.2.2 Batata yacon

Inicialmente, as batatas foram lavadas, descascadas e cortadas em fatias de aproximadamente 0.5 cm, com a posterior adição de ácido cítrico 0.1% (p/p) em relação ao conteúdo de yacon, para prevenir a oxidação e consequente escurecimento (VASCONCELOS *et al.*, 2015). Em seguida, as fatias foram trituradas em um processador (Britânia, Diamante 800, SC, BR) até a formação de um suco homogêneo.

Para o preparo da bebida fermentada, utilizou-se uma concentração de 82.7% de suco de yacon e 2% de grãos de kefir. A fermentação foi realizada por 24h a 35°C em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand, TECNAL TE-391, SP, Brasil), definido a partir de testes preliminares. Em seguida, os grãos foram retirados e o filtrado resultante foi refrigerado (aproximadamente 5°C) por mais 24h.

##### 3.2.3 Cacau

As sementes de cacau previamente trituradas em um processador de alimentos (Britânia, Diamante 800, SC, BR), foram pesadas e adicionadas ao Vegan Milk Machine (Polishop, SC, Brasil), junto de 1 litro de água destilada, sendo trituradas sob aquecimento por 30 min. Posteriormente, o leite de cacau resultante foi filtrado.

Para o preparo da bebida fermentada, utilizou-se uma concentração de 16% de leite de cacau e 5% de grãos de kefir. A fermentação foi realizada por 24h a 30°C em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand, TECNAL TE-391, SP, Brasil). Em seguida, os grãos foram retirados e o filtrado resultante foi refrigerado (aproximadamente 10°C) por mais 24h.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DA BEBIBA FERMENTADA EM CADA MATRIZ

#### 3.4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de cada uma das bebidas foi determinada por meio do método ABTS, de acordo com Re *et al.* (1999) modificado. Primeiramente, a solução de ABTS (Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em água até a concentração de 7 mM, seguida pela reação dessa solução com persulfato de potássio 2,45 mM. Essa reação deu como resultado, a solução de ABTS+, que foi mantida no escuro, em temperatura ambiente por 12 a 16 horas, de modo a formar os radicais ABTS. Posterior a esse período, a solução foi armazenada em geladeira, na temperatura de 2 a 8°C. Para a realização das análises, a solução foi mantida em temperatura ambiente e posteriormente diluída (1250 µl de solução-mãe em 50 ml de etanol:água 50%) até atingir um valor de absorvância de  $1,0 \pm 0,02$  a 734 nm (Leitor de Microplaca Filter Max F3/F5 Multimodo). Uma curva padrão foi elaborada para cada bebida, sendo elas diluídas com água deionizada, em 5 ou mais concentrações decrescentes que variavam de 45 a 0.5% (v/v) da amostra original.

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 270 µL de solução diluída de ABTS e 30 µL de cada amostra e, após 6 minutos de repouso no escuro, foi realizada a leitura a 734 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas, usando etanol como branco (Leitor de Microplaca Filter Max F3/F5 Multimodo).

As curvas foram consideradas aceitáveis quando  $R^2 > 0.98$ . Os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> e calculados a partir de uma curva de calibração na faixa linear, plotando a concentração final da bebida versus o índice de redução correspondente. O IR foi calculado para determinar o índice de redução dos radicais, a partir da seguinte fórmula:  $IR (\%) = [(AbsB - AbsT) / AbsB] \times 100$ , onde AbsB se refere à absorvância do branco e AbsT se refere à absorvância do teste (GUIDONI *et al.*, 2019).

#### 3.4.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada por meio de pHmetro digital (KASVI, K39-1014B). O eletrodo foi imerso diretamente na amostra, com a leitura sendo realizada após a estabilização do valor (BRASIL, 2019).

#### 3.4.3 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi feita por meio do reagente de Folin-Ciocalteu, segundo Karou *et al.* (2005). Inicialmente, os extratos de polifenóis foram preparados de acordo com Vinson *et al.* (2001). As amostras foram misturadas com a solução extratora, sendo essa formada por metanol (Neon, SP, Brasil) a 50% e ácido clorídrico (Neon, SP, Brasil) a 1.2 M, e então incubadas em banho-maria a 90°C por 3h. Em seguida, metanol puro (Neon, SP, Brasil) foi adicionado as amostras, sendo subsequentemente centrifugadas a 4193g (5000 rpm) por 5 minutos (Revan, 14000A, SP, Brasil).

Posteriormente, foi feita a adição da solução de Folin (1:1) ao extrato. Após 5 minutos de reação, uma solução de carbonato de sódio (Dinâmica, SP, Brazil) 20% foi adicionada e o volume completado com água deionizada. A solução foi deixada em repouso por 30 minutos e então foi feita a leitura da absorvância em 750 nm (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). O total de polifenóis foi determinado a partir da curva padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA), com concentrações variando de 3.0 a 40.0 µg/ml, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por ml de amostra.

#### 3.4.4 Teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi realizado de acordo com Yang, Martinson e Liu (2009), com modificações propostas por Fawole, Opara e Theron (2012). Inicialmente, 250 µL das amostras foram misturadas com 75 µL de solução de nitrito de sódio 5% (Dinâmica, SP, Brasil), 150 µL de cloreto de alumínio 10% (Dinâmica, SP, Brasil), 500 µL de hidróxido de sódio (Neon, SP, Brasil) (1 mol/L) e 775 µL de água destilada. A absorbância foi medida a 510 nm (Leitor de Microplaca Filter Max F3/F5 Multimodo). A curva padrão de quercetina foi traçada a partir da plotagem das absorbâncias geradas pela quercetina (Sigma-Aldrich, EUA), em 5 concentrações variando de 0.25 a 5.0 mg/ml. O total de flavonoides foi calculado ajustando a curva padrão com um equação linear (parâmetros de ajuste:  $y = 0,0281x + 0,0317$ ,  $R^2 = 0,9985$ ). Os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina (Eq Q) por ml de amostra.

### 3.4.5 Análise microbiológica

A análise microbiológica foi inicialmente feita pela diluição das amostras em solução salina. Posterior a isso, as amostras foram adicionadas a placas com seus respectivos meios de cultura, Man, Rogosa e Sharpe Agar (MRS) para *Lactobacillus sp.*; Plate Count Agar (PCA) para bactérias totais; Sabouraud Dextrose Agar (SDA) para a contagem de leveduras. O meio MRS foi incubado a 37°C por 24 a 72h, enquanto os meios PCA e SDA foram incubados aerobicamente a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, as placas com 30 a 300 colônias para PCA e 15 a 150 colônias para MRS e SDA foram contadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por ml de amostra (UFC/ml) (DEMIR, 2020; LEITE *et al.*, 2013).

### 3.4.6 Avaliação da toxicidade *in vivo* utilizando o organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

#### 3.4.6.1 Manutenção e sincronização

Os ensaios *in vivo* foram realizados em cepas de *Caenorhabditis elegans* N2 (selvagem), cedidas pelo Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

A manutenção dos nematoides foi feita em placas de meio de crescimento para nematoides (NGM), inoculadas com *Escherichia coli* OP50 e incubadas à 20°C (BRENNER, 1974). A sincronização, realizada com o intuito de uniformizar todos os nematoides no estágio L1, foi feita por meio do isolamento dos ovos de vermes grávidos (RANGSINTH *et al.*, 2019). Para isso, os nematoides foram transferidos para falcons, aos quais foram adicionados a solução de lise, composta por 1% NaOCl (Neon, SP, Brasil) e 0,25 M NaOH (Neon, SP, Brasil). Os tubos foram agitados vigorosamente e manualmente e, em seguida, centrifugados. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com água estéril, sendo novamente centrifugado, esse processo foi repetido uma série de vezes, com o intuito de concentrar os vermes. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os ovos sedimentados foram ressuspensos com solução tampão M9, sendo essa composta por 0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,08 M NaCl e 0,001 M MgSO<sub>4</sub> (Neon, SP, Brasil) e colocados em placas contendo o meio NGM inoculado previamente com *E. coli* OP50, sendo levados para incubação durante 16 horas para eclosão dos ovos (AUGUSTI *et al.*, 2017; CHARÃO *et al.*, 2015; RANGSINTH *et al.*, 2019).

#### 3.4.6.2 Tratamento

Os vermes previamente sincronizados, em estágio L1, foram expostos as bebidas fermentadas (KPS, KY e CK, respectivamente) e não fermentadas (PS, Y e CC, respectivamente) de soja, yacon e cacau por agitação constante por 30 minutos a 20°C. Os vermes tratados com solução tampão M9 e tampão M9 mais 50µl de levamisol 2,25% foram usados como controles negativo (CN) e controle positivo (CP), respectivamente. Pós-exposição, os nematoides foram lavados 3 vezes com tampão M9 para remover os tratamentos e, em seguida, transferidos para placas NGM previamente inoculadas com *E. coli* OP50, sendo esses vermes usados nas análises de mortalidade e desenvolvimento (AUGUSTI *et al.*, 2017).

#### 3.4.6.3 Mortalidade e desenvolvimento

De modo a realizar a análise de mortalidade, as placas, previamente tratadas, foram mantidas em uma incubadora B.O.D (Biochemical Oxygen Demand, TECNAL TE-391, SP, Brasil) por 24 horas à 20°C. Posterior ao período de incubação, os nematoides sobreviventes, presentes nas placas, foram contados (AUGUSTI *et al.*, 2017; CHARÃO *et al.*, 2015), por meio de um microscópio ótico (LEICA DM 500).

Por outro lado, a análise de desenvolvimento foi realizada 48h posterior ao tratamento, por meio da medida da área corporal ( $\mu\text{m}^2$ ) dos nematoides adultos em microscópico (LEICA DM 500). As placas contendo os vermes pós-tratamento foram lavadas com água autoclavada, seguido por transferência desses para eppendorfs, que foram mantidos em repouso de modo a decantar os vermes. Após esse período, o sobrenadante foi descartado. Esse processo foi repetido até a obtenção de uma solução límpida. Posteriormente, 15 µl da solução com os nematoides foram depositados sobre uma lâmina coberta por agarose e adicionados 30 µl de Levamisol 2,25%, de modo a “imobilizar” os vermes. Esses foram fotografados, com o intuito de medir o contorno corporal dos mesmos (10 medições em cada placa), realizado por meio do software AxioVision versão 4.8.2 (AUGUSTI *et al.*, 2017; CHARÃO *et al.*, 2015)

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar os parâmetros *in vitro* utilizados na caracterização das bebidas, foi realizado o teste t ao nível de 5% de probabilidade. Em relação a análise de toxicidade por meio do *C. elegans*, os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), ajustado para múltiplas comparações, e para resultados significativos ( $p \leq 0,05$ ) as médias foram comparadas pelo teste *post-hoc* de Tukey, na mesma probabilidade. A análise dos dados foi realizada pelo software SAS (Sistema de Análise Estatística - SAS Institute Inc., North Carolina, EUA 1989) versão online. Os resultados foram expressos como média, mais ou menos o erro padrão da média (E.P.M) com significância aceita acima de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

No presente estudo, foi verificada diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) na atividade antioxidante de todas as bebidas fermentadas quando comparadas as suas respectivas bebidas não fermentadas, conforme demonstrado na tabela 1.

**Tabela 1:** Valores do ensaio antioxidante ABTS obtidos por cada bebida pré e pós fermentação.

Bebida	ABTS (IC <sub>50</sub> %)
PS	8,50 ± 0,45
KPS	6,24 ± 0,99*
Y	2.50 ± 0.12
KY	1.88 ± 0.10*
CC	25,31 ± 2.10
CK	8.76 ± 1.74 *

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); KPS: Bebida fermentada de soja; PS: Bebida não-fermentada de soja; KY: Bebida fermentada de yacon; Y: Bebida não-fermentada de yacon; CK: Bebida fermentada de cacau; CC: Bebida não-fermentada de cacau. IC<sub>50</sub>: concentração em que 50% dos radicais livres foram reduzidos. \*Os valores foram considerados significantes para  $p \leq 0,05$

### 4.2 POLIFENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES E PH

Os resultados referentes a quantificação de polifenóis totais, flavonoides e da medição do pH das bebidas fermentadas e não fermentadas estão presentes na tabela 2.

**Tabela 2:** Valores de pH, polifenóis (Eq ácido gálico/ml) e flavonoides (Eq quercetina/ml) apresentados pré e pós fermentação

Bebida	pH	Polifenóis	Flavonoides
PS	6,64 ± 0,06	14.65 ± 0.64	2.36 ± 0.31
KPS	4,59 ± 0,04*	13.94 ± 0.49	8.69 ± 0.29*
Y	4.58 ± 0.09	27.30 ± 2.77	3.22 ± 0.90
KY	4.15 ± 0.17*	47.41 ± 1.69*	4.05 ± 0.68
CC	5,91 ± 0,02	4,41 ± 0,18	1,79 ± 0,23
CK	3,96 ± 0,04*	5,51 ± 0,23*	1,72 ± 0,01

KPS: Bebida fermentada de soja; PS: Bebida não-fermentada de soja; KY: Bebida fermentada de yacon; Y: Bebida não-fermentada de yacon; CK: Bebida fermentada de cacau; CC: Bebida não-fermentada de cacau. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. \*Os valores foram considerados significantes para  $p \leq 0,05$

Em relação aos polifenóis, apenas a bebida fermentada de soja não diferenciou estatisticamente ( $p > 0,05$ ) da sua respectiva bebida não fermentada. Por outro lado, tanto a bebida fermentada de cacau quando a de yacon não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ) quanto a quantidade de flavonoides.

### 4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Na tabela 3 estão apresentadas as contagens microbiológicas das bebidas fermentadas (KPS, KY, CK) e não fermentadas (PS, Y, CC) de soja, yacon e cacau, respectivamente.

**Tabela 3:** Quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) nas bebidas de soja, yacon e cacau fermentadas ou não por grãos de kefir

Microrganismos (UFC/ml)	Tempo	KPS	PS	KY	Y	CK	CC
CBT	48h	>800	-	$1.95 \times 10^7$	$2.19 \times 10^3$	$2.3 \times 10^5$	>800
Leveduras	48h	$2.5 \times 10^6$	-	$1.3 \times 10^4$	$7.63 \times 10^2$	$3 \times 10^5$	>800
	24h	$5.9 \times 10^6$	-	$5.08 \times 10^6$	<10	-	-
BAL	48h	$1.73 \times 10^7$	-	-	-	-	-
	72h	-	-	-	-	$1.3 \times 10^5$	>800

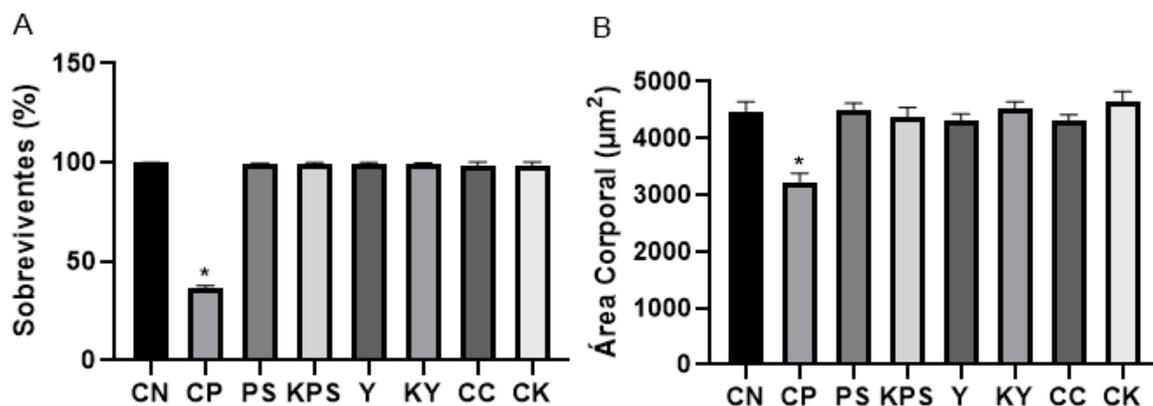
CBT: Contagem bacteriana total; BAL: Bactéria ácido-láctica; KPS: Bebida fermentada de soja; PS: Bebida não-fermentada de soja; KY: Bebida fermentada de yacon; Y: Bebida não-fermentada de yacon; CK: Bebida fermentada de cacau; CC: Bebida não-fermentada de cacau.

Observa-se que todas as bebidas fermentadas apresentaram uma contagem microbiológica maior posterior o processo de fermentação, sendo que a bebida não fermentada de yacon e a de cacau também apresentaram crescimento, demonstrando suas ações prebióticas quando comparadas a bebida não fermentada de soja.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO*

A figura 8 apresenta as análises referentes aos testes de sobrevivência e desenvolvimento dos nematoides, demonstrando que todas as bebidas, quando utilizadas no verme *C. elegans*, não apresentaram toxicidade, assim como foi apresentado no controle negativo ( $p > 0,05$ ).

Apenas o controle positivo (Levamisol) diferiu estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ), o que era previamente esperado, considerando que esse medicamento é um agente tóxico ao *C. elegans*.



**Figura 8:** Dados de toxicidade dos produtos fermentados (KPS, KY e CK) ou não (PS, Y e CC) usando o organismo modelo *C. elegans*. CN: controle negativo; CP: controle positivo; KPS: Bebida fermentada de soja; PS: Bebida não-fermentada de soja; KY: Bebida fermentada de yacon; Y: Bebida não-fermentada de yacon; CK: Bebida fermentada de cacau; CC: Bebida não-fermentada de cacau.. A: Dados de toxicidade por análise de sobrevivência. B: Dados de toxicidade por análise de desenvolvimento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*Os valores foram considerados significantes para  $p \leq 0,05$

## 5. DISCUSSÃO

Diversos autores concluíram que os grãos de kefir apresentam uma composição microbiológica simbiótica formada principalmente por bactérias do ácido acético, bactérias ácido-láticas e leveduras (SALEEM *et al.*, 2023; SOUZA *et al.*, 2024). Com base nas análises microbiológicas realizadas, verificou-se que houve aumento na contagem de microrganismos de todas as bebidas fermentadas. Staniszewski e Kordowska-Wiater (2021) reportam em seu estudo que para que um produto seja considerado probiótico, é necessário que ele apresente uma concentração mínima de  $10^6$  UFC/mL. Dessa forma, todas as bebidas fermentadas testadas alcançaram valores viáveis para serem classificadas como probióticos.

Inesperadamente, tanto a bebida não fermentada de yacon quanto a bebida não fermentada de cacau também apresentaram crescimento significativo de BAL e leveduras, estando esse crescimento possivelmente associado as suas propriedades prebióticas. Em relação a yacon, Prpich e colaboradores (2023) reforçam essa hipótese ao utilizar suco de yacon suplementado com peptona e fosfato dipotássico como meio de cultura para crescimento de *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus vitulinus*, identificando crescimento em todas as 3 concentrações do suco e forte influência da sua concentração no meio com a densidade bacteriana total. Da mesma forma, Kaewarsar *et al.* (2023) obtêm resultados semelhantes ao utilizar meios de cultura MRS suplementados com inulina, FOS e galactooligosacarídeos (GOS) para avaliar os efeitos da adição de prebióticos no crescimento de probióticos, constatando aumento significativo no crescimento de bactérias nesses meios.

Por outro lado, a atividade prebiótica do cacau está associada aos seus polifenóis, sendo esses capazes de modular a diversidade microbiológica ao promover a proliferação de certas bactérias, especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e inibir o crescimento de espécies patogênicas, principalmente as *Clostridium sp.* (SORRENTI *et al.*, 2020).

Em relação ao pH, assim como no estudo de Asadi Touranlou *et al.* (2023), todas as bebidas fermentadas apresentaram pH ácido, sendo essa característica atribuída ao processo de fermentação realizado pelas bactérias do ácido acético e bactérias ácido-láticas presentes nos grãos de kefir. Esse processo de acidificação é essencial de modo a prevenir o desenvolvimento de bactérias patogênicas e manter a estabilidade dos compostos fenólicos gerados durante a fermentação (GIUFFRÈ; GIUFFRÈ, 2024).

Cao *et al.* (2021), concluem que o pH é o principal fator que influencia na estabilidade dos polifenóis em frutas e vegetais, sendo esses compostos mais estáveis em pH abaixo de 5, não demonstrando sinais de degradação. Calvo *et al.* (2021) agregam a essa conclusão, concluindo que as enzimas peroxidase e polifenol oxidase, responsáveis por oxidar os polifenóis, apresentam atividade máxima em pH 5 a 5.5 e 7, respectivamente, reforçando a importância do pH ácido na preservação de compostos bioativos.

Os polifenóis são, em grande parte, divididos em dois grupos principais, os flavonoides e os não-flavonoides. Apesar de apresentar significativa atividade biológica, esses compostos apresentam baixa meia-vida e biodisponibilidade quando consumidos oralmente. Contudo, durante o processo de fermentação, microrganismos fermentadores liberam enzimas capazes de promover a biotransformação dos compostos fenólicos em moléculas menores e liberar ácidos fenólicos que estão ligados aos polissacarídeos da parede celular, aumentando tanto a quantidade quanto a diversidade de fenóis livres, potencializando sua bioatividade e biodisponibilidade (YANG *et al.*, 2023). Esses achados são coerentes com o aumento na quantidade de compostos fenólicos observado nas bebidas fermentadas de yacon e cacau. Por outro lado, a bebida fermentada de soja, apesar de não demonstrar aumento nesses compostos, não apresentou redução significativa, possivelmente devido ao pH abaixo de cinco mantido durante a fermentação.

Lasinskas *et al.* (2023) identificaram em seu estudo que, ao realizar fermentação aeróbica em fase sólida da *Chamerion angustifolium*, ocorre redução de flavonoides totais em meio aeróbico e aumento em meio anaeróbico. Huynh *et al.* (2014) agregam a esse achado, concluindo que o processo de fermentação não necessariamente aumenta todos os compostos fenólicos, sendo o tipo de microrganismo, as condições e o tempo de fermentação essenciais nesse processo. Esses achados estão de acordo com a presente pesquisa, visto que as bebidas fermentadas de yacon e cacau, apesar de apresentarem aumento dos polifenóis totais, não demonstraram diferença significativa quanto aos flavonoides, possivelmente indicando que os polifenóis foram convertidos a outros compostos.

Em relação a soja, Lodha, Das e Hati (2023), identificaram uma redução significativa na quantidade de polifenóis durante todo o período de fermentação de bebidas à base de soja, sendo essa diminuição atribuída a ação de microrganismos, possivelmente *Lactobacillus*, produtores da enzima ácido fenólico descarboxilase (PAD). Chan *et al.* (2024) corroboram com essa informação, destacando que a discrepância entre aumentos e reduções em compostos fenólicos e atividade antioxidante em produtos à base de soja fermentados por BAL dependem diretamente da cepa probiótica utilizada.

Apesar disso, a literatura amplamente documenta o aumento de flavonoides durante a fermentação de produtos à base de soja. Segundo Prado *et al.* (2022), as formas nativas de isoflavona apresentam baixa biodisponibilidade por estarem conjugadas a açúcares, minimizando sua absorção intestinal. Durante o processo de fermentação, a enzima  $\beta$ -glicosidase, produzida por microrganismos, converte as isoflavonas glicosiladas em agliconas, como a genisteína e a daidzeína, que são formas mais biologicamente ativas. Em produtos fermentados à base de soja, essa conversão pode alcançar entre 40 a 100%, justificando o aumento significativo de flavonoides na bebida fermentada de soja desenvolvida no presente estudo.

Estudos recentes demonstram que a atividade antioxidante de matrizes vegetais está fortemente relacionada aos mecanismos de ação dos polifenóis e flavonoides. Esses compostos bioativos apresentam grupos hidroxila (-OH) capazes de neutralizar os radicais livres que, em grandes quantidades, causam o estresse oxidativo. Além disso, alguns desses compostos são capazes de inibir ou regular as proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs) e o fator nuclear-kB (NF-kB), sendo ambos relacionados ao desenvolvimento de estresse oxidativo, ou estimular a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD e GPX (LV *et al.*, 2021).

Por outro lado, Côco *et al.* (2023) concluíram que os grãos de kefir apresentam forte atividade antioxidante, por meio da redução intracelular de EROs e modulação NADPH oxidase 2, sendo parte dessas ações relacionadas aos peptídeos presentes nos grãos. Papadopoulou *et al.* (2024) corroboram com esses resultados, indicando que o kefir é capaz de aumentar a expressão de SOD e CAT e a biodisponibilidade de compostos fenólicos e flavonoides presentes em seus substratos. Esses achados estão de acordo com a ação sinérgica que foi apresentada nas bebidas fermentadas do presente estudo, por meio do aumento da atividade antioxidante (ABTS), demonstrando que o kefir atua em conjunto da sua matriz para desencadear suas ações benéficas no organismo.

Devido a sua fácil cultura, curto ciclo de vida e baixa manutenção, o *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um nematoide amplamente utilizado como organismo modelo em diversas pesquisas. Além disso, por apresentarem um genoma cerca de 60 a 80% homólogo aos dos seres humanos, enzimas antioxidantes e isoenzimas comparáveis e grandes similaridades fisiológicas e metabólicas, esses vermes são particularmente úteis no estudo de propriedades antioxidantes, tóxicas e relacionadas a síndrome metabólica (LIN *et al.*, 2023; PANG *et al.*, 2024).

Zhang *et al.* (2024) identificam em seu estudo que muitas das vias de sinalização clássicas que regulam a fisiologia intestinal são similares entre humanos e o *C. elegans*.

Ademais, esses nematoides compartilham muitas semelhanças morfológicas e funcionais com as células epiteliais e intestinais humanas, permitindo utilizar esse organismo modelo para compreender os efeitos de substâncias tóxicas na função intestinal.

Em relação a fermentação, Skowron *et al.* (2022) concluem que ela é um processo que apresenta a capacidade de eliminar diversos tipos de compostos tóxicos presentes no material *in natura*, como alguns polifenóis, taninos e fitatos. Contudo, esse mesmo processo apresenta a possibilidade de influenciar a quantidade de micotoxinas presentes em alimentos, sendo essas toxinas letais para a saúde devido as suas atividades carcinogênicas, mutagênicas, citotóxicas e neurotóxicas.

Nesse contexto, Ragoubi *et al.* (2021) constatam que as BAL produzem metabólitos antifúngicos que causam redução no crescimento de fungos e redução na síntese de micotoxinas. Além disso, outro fator responsável por essa diminuição é a competição pelo nicho ocupado e por nutrientes necessários para o seu crescimento (SKOWRON *et al.*, 2022). Esses achados estão de acordo com o presente estudo, não havendo toxicidade ou alteração no desenvolvimento do *C. elegans* em todas as bebidas fermentadas, podendo-se inferir que elas são consideradas seguras na alimentação.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a fermentação dos substratos presentes nesse estudo (soja, yacon e cacau) aumentam a sua atividade antioxidante, capacidade probiótica, ao promover o desenvolvimento de bactérias ácido-láticas e leveduras, e não apresentam toxicidade ao organismo modelo *C. elegans*. Ademais, foi possível identificar o potencial prebiótico das bebidas não fermentadas de yacon e cacau por meio do maior crescimento de bactérias pré-fermentação quando comparadas a soja. Dessa forma, essas bebidas fermentadas se tornam possíveis alimentos funcionais não-lacteis que podem ser direcionados a consumidores vegetarianos, veganos, intolerantes à lactose ou alérgicos as proteínas do leite. Contudo, estudos clínicos mais aprofundados devem ser realizados com o intuito de avaliar a eficiência dessas bebidas na prevenção e tratamento de doenças crônicas e progressivas relacionadas ao estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

**AGROADVANCE.** Fenologia da soja. Disponível em: <https://agroadvance.com.br/blog-fenologia-da-soja/>. Acesso em: 03 nov. 2024.

ALONSO-PIÑEIRO, J. A. et al. **Nrf2 and heme oxygenase-1 involvement in atherosclerosis related oxidative stress.** *Antioxidants*, 2021.

AMERIZADEH, A. et al. **Effect of Genistein Intake on Some Cardiovascular Risk Factors: An Updated Systematic Review and Meta-analysis.** *Current Problems in Cardiology*, 2022.

AMOAH, I. et al. **Effect of Cocoa Beverage and Dark Chocolate Consumption on Blood Pressure in Those with Normal and Elevated Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Foods*, 2022.

APALOWO, O. E. et al. Nutritional Characteristics, Health Impact, and Applications of Kefir. *Foods*, v. 13, n. 7, p. 1026, 2024.

**APROSOJA BRASIL.** A soja. Disponível em: <https://aprosojabrasil.com.br/a-soja/>. Acesso em: 03 nov. 2024.

ASADI TOURANLOU, F. et al. **Application of kefir for reduction of contaminants in the food industry: A systematic review.** *International Dairy Journal*, 2023.

AUGUSTI, P. R. et al. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, 2017.

AZI, F. et al. Metabolite dynamics and phytochemistry of a soy whey-based beverage bio-transformed by water kefir consortium. *Food Chemistry*, v. 342, 2021.

AZIZI, N. F. et al. **Kefir and its biological activities.** *Foods*, 2021.

BAKER, M. T. et al. **Consumer Acceptance toward Functional Foods: A Scoping Review.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022.

BATTY, M.; BENNETT, M. R.; YU, E. **The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis.** *Cells*, 2022.

BEVILACQUA, A. et al. **An Update on Prebiotics and on Their Health Effects.** *Foods*, 2024.

**BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).** Brasileiro é premiado: conheça a trajetória do cacau. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasileiro-e-premiado-conheca-a-trajetoria-do-cacau>. Acesso em: 10 nov. 2024.

**BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).** Cartilha Cacau do Brasil: versão português. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). Brasília, 2022.

Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/folders/cartilha-cacau-do-brasil-versao-portugues.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2024.

**BRASIL. Ministério da Saúde (MS).** *Farmacopeia Brasileira*. 6. ed. v. 2. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, 1974.

CABI. *Smallanthus sonchifolius* (yacón). **CABI Compendium**, 2022.

CALVO, A. M. et al. Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

CAO, H. et al. **Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing.** **Food Frontiers**, 2021.

CHAN, S. et al. Harnessing Fermented Soymilk Production by a Newly Isolated *Pediococcus acidilactici* F3 to Enhance Antioxidant Level with High Antimicrobial Activity against Food-Borne Pathogens during Co-Culture. **Foods**, v. 13, n. 13, p. 2150, 2024.

CHARÃO, M. F. et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, 2015.

CHEN, Q. et al. Comparison of phenolic and flavonoid compound profiles and antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties of cultivated soybean (*Glycine max*) and wild soybean (*glycine soja*). **Plants**, v. 10, n. 4, 2021.

CISNEROS-YUPANQUI, M. et al. **The  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Capacity of Grape Pomace: A Review.** **Food and Bioprocess Technology**, 2023.

COJOCARU, K. A. et al. **Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Therapeutic Strategies in Diabetes, Obesity, and Cardiovascular Disease.** **Antioxidants**, 2023.

CÔCO, L. Z. et al. Unravelling the Gastroprotective Potential of Kefir: Exploring Antioxidant Effects in Preventing Gastric Ulcers. **Cells**, v. 12, n. 24, 2023.

COUTO, M. et al. Probiotic treatment with Kefir reduces vascular oxidative stress while suppressing COX2 mediated relaxation in intestinal arteries of an animal model of menopause. **Indian Journal of Experimental Biology**, 2023.

COZER, A. W. D. et al. Effects of Iron-Fortified Foods on the Nutritional Status of Children Residing in Regions Vulnerable to Parasitic Diseases: A Systematic Review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 29, n. 1, p. 8–17, 2024.

CRUZ, B. C. DOS S. et al. Evaluation of the efficacy of probiotic VSL#3 and synbiotic VSL#3 and yacon-based product in reducing oxidative stress and intestinal permeability in mice induced to colorectal carcinogenesis. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 4, 2021.

CUFAOGLU, G.; ERDINC, A. N. **An alternative source of probiotics: Water kefir.** *Food Frontiers*, 2023.

CULPEPPER, T. The Effects of Kefir and Kefir Components on Immune and Metabolic Physiology in Pre-Clinical Studies: A Narrative Review. *Cureus*, 2022. .

DAVY, P.; VUONG, Q. V. Soybean Processing By-Products and Potential Health Benefits. In: **Phytochemicals in Soybeans**. [s.l: s.n.].

DICKS, L. et al. **Effect of an (-)-Epicatechin Intake on Cardiometabolic Parameters—A Systematic Review of Randomized Controlled Trials.** *Nutrients*, 2022.

DEMIR, H. Comparison of traditional and commercial kefir microorganism compositions and inhibitory effects on certain pathogens. *International Journal of Food Properties*, v. 23, n. 1, 2020.

DE SOUZA, C. P. G. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) beverage spontaneously fermented. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 45, n. 1, 2024.

DE SOUZA, H. F. et al. **Bibliometric analysis of water kefir and milk kefir in probiotic foods from 2013 to 2022: A critical review of recent applications and prospects.** *Food Research International*, 2024.

DO PRADO, F. G. et al. **Fermented Soy Products and Their Potential Health Benefits: A Review.** *Microorganisms*, 2022.

DWIVEDI, S. et al. **Significance of Soy-Based Fermented Food and Their Bioactive Compounds Against Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Diseases.** *Plant Foods for Human Nutrition*, 2024.

EGEA, M. B. et al. **A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022.

ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N. **Mitigation of antibiotic resistance using probiotics, prebiotics and synbiotics. A review.** *Environmental Chemistry Letters*, 2022.

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA.**

Características da soja. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/caracteristicas-da-especie-e-relacoes-com-o-ambiente/caracteristicas-da-soja>. Acesso em: 03 nov. 2024.

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA.** Dados econômicos da soja. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 03 nov. 2024.

ESSA, M. M. et al. **Functional foods and their impact on health.** *Journal of Food Science and Technology*, 2023.

FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L.; THERON, K. I. Chemical and Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Three Pomegranate Cultivars Grown in South Africa. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, 2012.

FIJAN, S. **Probiotics and Their Antimicrobial Effect**. **Microorganisms**, 2023.

FREITAS, Í. R.; PIRANI, J. R.; COLLI-SILVA, M. CACAU PARA QUÊ? LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE OS USOS MATERIAIS E SIMBÓLICOS DAS ESPÉCIES DE CACAUS DO BRASIL. **Ethnoscintia - Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology**, v. 8, n. 1, 2023.

GENTRY, B.; CAZÓN, P.; O'BRIEN, K. **A comprehensive review of the production, beneficial properties, and applications of kefir, the kefir grain exopolysaccharide**. **International Dairy Journal**, 2023.

GIANAZZA, E. et al. Lipid Peroxidation in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 34, n. 1, 2021.

GIUFFRÈ, D.; GIUFFRÈ, A. M. Fermentation Technology and Functional Foods. **FBE**, v. 16, n. 1, 2024.

GOMES, A. F. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and kefir improved intestinal and bone health but without symbiotic benefits in rats. **Nutrition Research**, v. 118, 2023.

GOMES, L. R. R. et al. Fermented soybean beverage improves performance and attenuates anaerobic exercise oxidative stress in Wistar rat skeletal muscle. **PharmaNutrition**, v. 16, 2021.

GUIDONI, M. et al. Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 2, 2019.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, ago. 2020.

HID, E. J. et al. **(-)-Epicatechin and cardiometabolic risk factors: a focus on potential mechanisms of action**. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, 2022.

HÍJOVÁ, E. Benefits of Biotics for Cardiovascular Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6292, 2023.

HUANG, Z. et al. **The Beneficial Role of Nrf2 in the Endothelial Dysfunction of Atherosclerosis**. **Cardiology Research and Practice**, 2022.

HUYNH, N. T. et al. **Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: A review**. **International Journal of Molecular Sciences**, 2014.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)**. Cacau: Produção agropecuária. IBGE Explica, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/br>. Acesso em: 10 nov. 2024.

JOMOVA, K. et al. **Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging.** *Archives of Toxicology*, 2023.

JENA, A. B. et al. **Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2023.

JIANG, H. et al. **Drug-induced oxidative stress in cancer treatments: Angel or devil?** *Redox Biology*, 2023.

KAEWARSAR, E. et al. Optimization of Mixed Inulin, Fructooligosaccharides, and Galactooligosaccharides as Prebiotics for Stimulation of Probiotics Growth and Function. *Foods*, v. 12, n. 8, 2023.

KALIL, I. **Utilização de kefir de água como alternativa probiótica na produção de bebida fermentada de soja.** 2021. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2021. Disponível em: <https://pgbv.uenf.br/wp-content/uploads/2022/06/2021-DS-Ieda-Kalil-1.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2024.

KLRAN, T. R.; OTLU, O.; KARABULUT, A. B. **Oxidative stress and antioxidants in health and disease.** *Journal of Laboratory Medicine*, 2023.

HERINGER, K. **Obtenção de produto probiótico à base de soja e kefir com potencial antioxidante e efeito sobre a aterosclerose experimental.** 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, Vila Velha, 2020. Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

KAROU, D. et al. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 8, 2005.

LANGA, S. et al. **Isoflavone Metabolism by Lactic Acid Bacteria and Its Application in the Development of Fermented Soy Food with Beneficial Effects on Human Health.** *Foods*, 2023.

LASINSKAS, M. et al. The Impact of Solid-Phase Fermentation on Flavonoids, Phenolic Acids, Tannins and Antioxidant Activity in *Chamerion angustifolium* (L.) Holub (Fireweed) Leaves. *Plants*, v. 12, n. 2, 2023.

LATIF, A. et al. **Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries.** *Frontiers in Microbiology*, 2023.

LEITE, A. M. O. et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 7, 2013.

LEYANE, T. S.; JERE, S. W.; HOURELD, N. N. **Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2022.

- LIAO, C. H. et al. Novel Kefir Exopolysaccharides (KEPS) Mitigate Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Systemic Inflammation in Luciferase Transgenic Mice through Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway. **Antioxidants**, v. 12, n. 9, 2023.
- LIN, Y. et al. **Caenorhabditis elegans as an in vivo model for the identification of natural antioxidants with anti-aging actions. Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2023.
- LI, L. et al. **Oxidative Stress, Inflammation, Gut Dysbiosis: What Can Polyphenols Do in Inflammatory Bowel Disease? Antioxidants**, 2023.
- LI, Z. et al. The effect and mechanism of inulin on atherosclerosis is mediated by the characteristic intestinal flora and metabolites. **Coronary Artery Disease**, v. 35, n. 6, 2024.
- LODHA, D.; DAS, S.; HATI, S. Antioxidant activity, total phenolic content and biotransformation of isoflavones during soy lactic-fermentations. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 6, 2021.
- LV, Q. Z. et al. **Current State of Knowledge on the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Polyphenolic Compounds. Natural Product Communications**, 2021.
- MARQUES, C. et al. Sensory profile estimation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) juice acidified with lactobionic acid: Combination of flash profile, E-nose and sensometrics: E-nose and Flash Profile Correlating Sensometrics of Yacon Juice. **Food Chemistry Advances**, v. 4, 2024.
- MASENGA, S. K. et al. **Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. International Journal of Molecular Sciences**, 2023.
- MOISÉS, E. G. M. Registros sobre o consumo medicinal do cacau nas publicações científicas setecentistas. In: FRANCO, S. P. *et al* (org.). **X Colóquio de História das Doenças**. Serra: Milfontes, 2023. p. 142-163
- MORAES, F. **Obtenção de produto simbiótico à base de yacon e kefir com potencial antioxidante e efeito sobre a hipertensão experimental**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, Vila Velha, 2020. Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.
- NOBRE, C. et al. Fructooligosaccharides production and the health benefits of prebiotics. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Technologies for Production of Nutraceuticals and Functional Food Products**. [s.l: s.n.].
- PANG, X. et al. Impact of Molecular Weight Variations in *Dendrobium officinale* Polysaccharides on Antioxidant Activity and Anti-Obesity in *Caenorhabditis elegans*. **Foods**, v. 13, n. 7, p. 1040, 2024.
- PAPADOPOULOU, D. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of water kefir microbiota and its bioactive metabolites for health promoting bio-functional products and applications. **AIMS Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 756–811, 2024.

- PENG, F. et al. Development of yacon syrup fermented by *Lactiplantibacillus plantarum* NCU001043: Metabolite profiling, antioxidant and glycosidase inhibition activity. **LWT**, v. 169, 2022.
- PIMENTA-MARTINS, A. et al. Factors associated with the consumption of voluntarily fortified foods with micronutrients by the Portuguese population. **Nutrition Bulletin**, v. 49, n. 3, p. 278–293, 2024.
- PRPICH, N. P. et al. Yacon juice as culture and cryoprotectant medium for *Lactilactobacillus sakei* and *Staphylococcus vitulinus* autochthonous strains. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 26, 2023.
- QIN, P.; WANG, T.; LUO, Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, 2022.
- QU, Z. et al. **Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin. Critical reviews in food science and nutrition**, 2021.
- RAGOUBI, C. et al. Mycotoxin Removal by *Lactobacillus* spp. and Their Application in Animal Liquid Feed. **Toxins**, v. 13, n. 3, 2021.
- RAJLIC, S. et al. **Early Detection Is the Best Prevention—Characterization of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and Its Consequences on the Cardiovascular System. Cells**, 2023.
- RAMOS-ESCUADERO, F. et al. Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **LWT**, v. 147, 2021.
- RANGSINTH, P. et al. Leaf extract of *Caesalpinia mimosoides* enhances oxidative stress resistance and prolongs lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, 2019.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, 1999.
- ROE, A. L. et al. **Considerations for determining safety of probiotics: A USP perspective. Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2022.
- SALEEM, K. et al. **Nutritional and functional properties of kefir: review. International Journal of Food Properties**, 2023.
- SALES, S. DA S. et al. Previous gut microbiota has an effect on postprandial insulin response after intervention with yacon syrup as a source of fructooligosaccharides: a randomized, crossover, double-blind clinical trial. **Nutrition**, v. 109, 2023.
- SANTOS, H. O.; TINSLEY, G. M. **Is breakfast consumption detrimental, unnecessary, or an opportunity for health promotion? A review of cardiometabolic outcomes and functional food choices. Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 2024.

SEO, K. H. et al. Effects of kefir lactic acid bacteria-derived postbiotic components on high fat diet-induced gut microbiota and obesity. **Food Research International**, v. 157, 2022.

SHENG, Y. et al. **Catechins: Protective mechanism of antioxidant stress in atherosclerosis**. **Frontiers in Pharmacology**, 2023.

SORRENTI, V. et al. **Cocoa polyphenols and gut microbiota interplay: Bioavailability, prebiotic effect, and impact on human health**. **Nutrients**, 2020.

STANISZEWSKI, A.; KORDOWSKA-WIATER, M. Probiotic and potentially probiotic yeasts—characteristics and food application. **Foods**, v. 10, n. 6, 2021.

SKOWRON, K. et al. **Two Faces of Fermented Foods—The Benefits and Threats of Its Consumption**. **Frontiers in Microbiology**, 2022.

TAVŞANLI, N. et al. Evaluating the potential effect of microalgae on soymilk vegan kefir in terms of physical, chemical, microbiological properties. **Algal Research**, v. 82, p. 103630, 2024.

TISS, M. et al. Fermented soy milk prepared using kefir grains prevents and ameliorates obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia and Liver-Kidney toxicities in HFFD-rats. **Journal of Functional Foods**, v. 67, 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ). Museu Nacional. Theobroma cacao**. Herbário e Horto Botânico do Museu Nacional, 2024. Disponível em: <https://www.museunacional.ufrj.br/hortobotanico/arvoresearbustos/theobromacacao.html>. Acesso em: 10 nov. 2024.

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

VINSON, J. A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, 2001.

YAN, Q. et al. **Targeting oxidative stress as a preventive and therapeutic approach for cardiovascular disease**. **Journal of Translational Medicine**, 2023.

YANG, F. et al. **Effects of Fermentation on Bioactivity and the Composition of Polyphenols Contained in Polyphenol-Rich Foods: A Review**. **Foods**, 2023.

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, 2009

YOU, S. et al. **The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review**. **Frontiers in Nutrition**, 2022.

ZHANG, M. et al. **Health benefits and mechanisms of theobromine**. **Journal of Functional Foods**, 2024.

ZHANG, X.-P. et al. Exploring the potential use of *Caenorhabditis elegans* as an animal model for evaluating chemical-induced intestinal dysfunction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 493, p. 117140, 2024.