

HUDSARA APARECIDA DE ALMEIDA PAULA

**EFEITO PREBIÓTICO DE PRODUTO À BASE DE YACON (*SMALLANTHUS
SONCHIFOLIUS*) NA MODULAÇÃO DE INDICADORES DA SAÚDE ÓSSEA
EM RATAS WISTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P324e
2013

Paula, Hudsara Aparecida de Almeida, 1982-

Efeito prebiótico de produto à base de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na modulação de indicadores da saúde óssea em ratas wistar / Hudsara Aparecida de Almeida Paula. – Viçosa, MG, 2013.

xv, 202f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Smallanthus sonchifolius*. 2. Ovariectomia. 3. Ossos - Doenças. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.024

HUDSARA APARECIDA DE ALMEIDA PAULA


**EFEITO PREBIÓTICO DE PRODUTO À BASE DE YACON
(SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS) NA MODULAÇÃO DE INDICADORES
DA SAÚDE ÓSSEA EM RATAS WISTAR**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 28 de junho de 2013.


Mário Jefferson Quirino Louzada


Sônia Machado Rocha Ribeiro


Tânia Toledo de Oliveira


Rita de Cássia Lanes Ribeiro


Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

"A ambição da verdadeira pesquisa é abrir caminhos para novas perguntas"
(Henry Carbin)

"Antes de começar o trabalho de modificar o mundo, dê três voltas dentro da sua casa – experimente fazer tudo com amor, com muito amor, com todo amor" (São Pe. Pio).

Ao meu pai, **Jacinto**.

Homem simples, lavrador e barbeiro, que não teve oportunidade de ter um diploma, mas que movido de uma enorme sabedoria e amor, além de uma dedicação ilimitada pela família, nunca mediu esforços para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar e ter uma profissão, tornando este objetivo sua própria luta e seu maior orgulho!

A minha mãe, **Geralda**.

Por tudo que me ensinou nas palavras, nos exemplos, mas principalmente nos silêncios! Obrigada pelo amor, pelas orações, por todas as privações em meu favor e pelo apoio que amorteceram os percalços do caminho. Incompreensivelmente você partiu deste mundo no dia da defesa desta tese... "foi levada para o país da Vida, sua morada é o descanso, sua roupa é a luz. O sol brilhará para sempre em seu rosto e uma paz intangível assegurará definitivamente suas fronteiras". A doçura, bondade e simplicidade que se expandia de seus lábios e de seu olhar, temperou meus dias e hoje sinto que nosso amor permanecerá VIVO, embora estejamos em dimensões diferentes. Você vive em mim! Creio que a reencontrarei para poder sentir o toque suave do seu abraço e o brilho do seu olhar, novamente.

Aos meus irmãos: **Aparecida Márcia, Rildo, Rinaldo e Hudson**.

Por serem meus maiores referenciais e inspiradores. Vocês são o melhor de todos os livros que já li! Obrigada por me fazerem vivenciar, pelas suas atitudes, o mais verdadeiro sentido da palavra família, por todo o cuidado e todo o auxílio (em todos os aspectos que essa palavra possa alcançar). Rildo e Rinaldinho a vocês devo ainda minha paixão pela UFV (desde a infância) e o sonho de vir estudar aqui!

"Dar o exemplo não é a melhor maneira de influenciar os outros – é a única"
(Alberti Schweitzer)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e aos Departamentos de Tecnologia de Alimentos e de Nutrição e Saúde por toda minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo recurso financeiro utilizado na execução do projeto.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” campus de Araçatuba, pela possibilidade de execução das análises ósseas.

**

Agradecimento Especial

“É tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá e é tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar” (Gonzaquinha)

Deixo registrado todo meu RESPEITO, ADMIRAÇÃO e GRATIDÃO:

À minha orientadora, professora **Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira**, pela dedicação ilimitada que alia a competência técnica à competência ética. Obrigada por me ensinar a construir e reconstruir; pelos conhecimentos e pelas oportunidades que me concedeu e por todos os direcionamentos.

À professora **Neuza Brunoro**, pela oportunidade de ter contado com sua orientação após o ingresso no doutorado e por todo o incentivo antes mesmo de dar início ao mesmo.

À professora **Hércia Martino**, pelo exemplo profissional, por todo o suporte e contribuições durante os ensaios biológicos, pelas sábias sugestões, pela prontidão e pelo sorriso sempre acolhedor.

À professora **Tânia Toledo**, por toda a receptividade e valioso auxílio na realização de diferentes análises. Pelas orientações e ensinamentos que em muito perpassaram “o mundo acadêmico”.

Ao professor **Mário Jefferson Quirino Louzada**, por toda orientação e acompanhamento nas diferentes análises realizadas no campus da Unesp de Araçatuba, SP. Obrigada pelo acolhimento, pelo suporte, pelos ensinamentos e por todo o respeito e carinho com que sempre fui recebida no laboratório, tornando o trabalho agradável e motivador.

À professora **Lukiya Campos Favarato**, por ter gentilmente aceitado colaborar com o trabalho, como responsável técnica e coordenadora de todo o procedimento cirúrgico dos animais e a toda sua equipe de trabalho do Hospital Veterinário da UFV.

Ao professor **Antônio Carlos Gomes de Souza** (Tonca), pelas ricas orientações e prontidão constante na elaboração do produto à base de yacon, que foi desenvolvido e utilizado neste trabalho.

À professora **Edimar Fontes**, pelo valioso auxílio nas análises estatísticas, exemplo fecundo de competência e disposição incondicional em ajudar.

À professora **Sirlene Rodrigues Sartori**, pelas orientações e suporte nas análises histológicas.

À **Cristiane Oliveira e Marcelo Bonnet** por comporem a banca de qualificação, acrescentando e mudando a minha perspectiva.

Ao professor **Leandro Licursi de Oliveira**, que permitiu a utilização do laboratório para realização do imunoensaio e por todas as dicas.

A professora **Sônia Machado Rocha Ribeiro**, por ter aceitado participar da defesa de tese, e pelas contribuições enriquecedoras para o trabalho.

Aos colegas e professores do programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, com os quais compartilhei momentos de aprendizagem, que contribuíram para a minha formação, sobretudo: **Valéria Minim, José Benício, Juliana Nóbrega, Rita Navarro, Alexandre Navarro, Raniele Fagundes, Roney Rocha e Yasmim Resende.**

Aos funcionários: **José Geraldo** (Laboratório de Biofármacos/UFV), **José Raimundo, José Simião, José Geraldo, Nivaldo Rufino, Carla Santana, Letícia Coelho, Maria Geralda da Costa, Pollyana de Souza, Manoel Pires** (Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFV), **Eduardo Resende** (Departamento de Química/UFV), **Antônio Carlos Alves** (Departamento de Solos/UFV), **Adão Carlos Cardoso** (Departamento de Veterinária/UFV), por toda a colaboração que foi imprescindível.

Aos residentes em Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba, SP: **Rafael Castro e Gabriela Bellegard**, por todo o auxílio na obtenção das imagens ósseas.

Aos indescritíveis **Bruna Resende e Pedro Florindo**, por toda a cooperação no trabalho e companheirismo durante minha permanência em Araçatuba, SP.

Aos estagiários do projeto de doutorado: **Natália, Juninho, Camila, Leise, Paola, Eliara e Josilene**, pela dedicação e comprometimento. Vocês fizeram toda a diferença!

Agradeço também: **Adriano Simões, Ana Carolina, Bárbara Fernandes, Cassiano Silva, Érica Moraes, Frederico Franco, Gilson Júnior, Márcia da Silva, Luciana Gontijo, Ângela, Vitor, Lucas Drummond, Felipe Drummond, Camila Chagas, Tatiana Fiche**, que me auxiliaram nas mais diferentes atividades.

**

Amigos...

“Tem gente que tem cheiro de passarinho quando canta, de sol quando acorda, de flor quando ri... Ao lado delas, a gente se sente no balanço de uma rede sem relógio e sem agenda. Ao lado delas, a gente se sente comendo pipoca na praça, lambuzando o queixo de sorvete... Melando os dedos com algodão doce, da cor mais doce que tem para escolher. O tempo é outro. E a vida fica com a cara que ela tem de verdade, mas que a gente desaprende a ver. O tempo é outro. Tem gente que tem cheiro do colo de Deus. De banho de mar quando a água é quente e o céu é azul. Ao lado delas, a gente sabe que os anjos existem e que alguns são invisíveis. Tem gente que tem cheiro das estrelas que Deus acendeu no céu e daquelas que conseguimos acender na Terra. Ao lado delas, a gente não acha que o amor é possível, a gente tem certeza. Ao lado delas a gente se sente visitando um lugar feito de alegria. Recebendo um buquê de carinhos. Abraçando um filhote de urso panda. Ao lado delas, saboreamos a delícia do toque suave de sua presença soprando nosso coração. Tem gente que tem cheiro do acalento que o silêncio canta, de passeio no jardim... Ao lado delas, a gente lembra que no instante em que rimos Deus está conosco, juntinho ao nosso lado” (Ana Jacomo).

“A amizade é o encontro de almas que se reverenciam” (Pe. Fábio de Melo).

“Abençoados os que possuem amigos... os que os têm sem pedir... amigo a gente sente!” (Machado de Assis).

À Gardênia Campos Mata e Monise Viana Abranches, que muito mais que amigas a vida agraciou-me como “irmãs”! Agradeço por terem compartilhado confidências, prantos e alegrias. Vocês literalmente me “pegaram pela mão”, “reconduziram meus passos” nos momentos em que mais precisei e me mostraram que de fato “quem ama cuida”. Estendo aqui todo afeto a suas famílias, que me acolheram durante toda a minha permanência em Viçosa. Edson e Eloísa Abranches, José Maria e Flaviana Campos Mata e a querida “Vó Ana”.

Às preciosas amigas: **Aline Macabeu, Ana Marcelina de Oliveira, Bianca Lasmar, Bianka Salvador, Daniela Oliveira, Dorina Natal, Christiane Mileib, Fernanda Vidigal, Gislene Fernandes, Isabela Fonseca, Jackline Brilhante, Juliana Fernandes, Júnia Geraldo, Lenice Oliveira, Mariana Cazal, Naiara Barbosa, Sandra dos Anjos e Vânia Nakajima**, pelo carinho imensurável, pelo cuidado, e pela leveza, suavidade e docilidade com que sempre se fizeram presentes na minha vida.

Ao querido **Łukasz Grześkowiak**, pelos agradáveis momentos, pelas conversas edificantes, pelas aulas de inglês e pela constante força.

Ao estimado **Marcelo Rocha da Costa**, pelas valiosas contribuições em relação ao trabalho, pelos ricos conselhos, pelas palavras amigas, pela força e pelo apoio diferencial.

À **Damiana Diniz Rosa**, por toda a generosidade, que muito me ajudou de todas as formas que lhe foram possíveis.

À **professora Rita de Cássia Lanes Ribeiro**, por ter deixado marcas tão boas na minha vida. *“Tem gente que nem percebe que tem a alma perfumada! E esse perfume é dom de Deus” (Ana Jacomo).*

À **Ana Íris Coelho e Maria Teresa Fialho de Souza Campos**, pela sabedoria, simplicidade e carinho que sempre demonstraram.

Ao casal **Mark e Kathlen Haslan**, pela consideração que sempre me dispensaram.

Ao admirado **Fábio Nascimento**, por ter iluminado a minha vida.

Aqueles que foram para mim os “Doutores da Alegria”: **Lairton Andrade e Rosana Cognalato**, por não terem negligenciado em momento algum as minhas “dores” e por terem me auxiliado, além de todo o suporte terapêutico, a compreender que a felicidade é uma realidade que você constrói!

**

Aos **animais** que compuseram este trabalho, seres sensíveis, passíveis de sofrimento, e que tanto contribuíram na busca do conhecimento sobre a vida, deixo registrado meu reconhecimento aos seus valores e direitos.

**

“Onde está o teu tesouro aí estará o teu coração” (Mt, 6, 21)

À **toda minha família**, em especial à **Amélia e Gabriel** pelo apoio que sempre me ofereceram. E aos sobrinhos: **Tibério, Andrei, Arthur, Katharina e Niara** por serem uma fonte inesgotável de alegria para o meu coração, mesmo à distância.

**

“É fácil sentir a mão de Deus em tudo!” (Djavan)

À **Fraternidade Pequena Via** que foi um apoio diferencial de fé e crescimento em minha caminhada espiritual.

A **Deus**, luz suprema, pelas infinitas misericórdias, por me conceder a graça de conhecer e conviver com todos os anteriormente citados, por me amparar a cada dia nas minhas necessidades, e por me conduzir a buscá-lo para encontrar a plenitude da vida.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>): a food with multiple functions	3
Abstract.....	3
Introduction.....	4
General information on Yacon.....	4
Functional properties of yacon.....	10
Functional effects of yacon.....	15
Conclusions.....	17
References.....	18
2.2. Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>): fonte de frutanos prebióticos com perspectivas promissoras na saúde óssea pós-menopausa	25
Resumo.....	25
Introdução.....	25
Aspectos metabólicos e nutricionais do cálcio.....	29
Yacon, frutanos tipo inulina e Saúde Óssea.....	32
Modelo animal para osteoporose.....	36
Tecido ósseo.....	37
Biomarcadores do metabolismo ósseo.....	39
Biomecânica do tecido ósseo.....	42
Considerações Finais.....	44
Referências Bibliográficas.....	44
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS DO ESTUDO	54
Hipóteses.....	54
Objetivo geral.....	54
Objetivos específicos.....	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1. Produto à base de Yacon (PBY).....	55
4.2. Determinação da composição centesimal e teor de frutanos tipo inulina do produto à base de yacon (PBY).....	56

4.3. Pré-Experimento.....	57
4.4. Experimento.....	57
4.4.1. Animais experimentais.....	57
4.5. Delineamento Experimental.....	59
4.6. Dietas Experimentais.....	60
4.7. Cirurgia de Ovariectomia ou Celiotomia.....	61
4.8. Determinação do Balanço de Cálcio.....	63
4.9. Eutanásia dos animais.....	65
4.10. Análise do desempenho dos animais.....	66
4.11. Análise de pH, peso do ceco e ácidos orgânicos do conteúdo cecal.....	66
4.12. Determinação do Conteúdo Mineral Ósseo.....	67
4.13. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.....	68
4.14. Avaliação da Densidade Mineral Óssea.....	70
4.15. Análise Física – Propriedades Biomecânicas.....	71
4.16. Análise estatística.....	77
4.17. Aspectos Éticos.....	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
5.1. ARTIGO: – Pré-Experimento.....	80
5.2. ARTIGO: – Experimento – Fase 1.....	98
5.3. ARTIGO: – Experimento – Fases 2 e 3.....	116
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	144
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
8. ANEXOS.....	148
8.1. Termo de aprovação da pesquisa com animais pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa.....	148
9. APÊNDICES.....	150
9.1. Apêndice I: Tabelas da análise de variância referente aos dados do artigo: “Fecal score and cecum profile of Wistar rats fed a novel yacon based product source of Fructooligosaccharides/inulin”.....	150
9.2. Apêndice I: Tabelas da análise de variância referente aos dados do artigo: “Produto à base de yacon (Smallanthus sonchifolius) modula biomarcadores do metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas?”.....	152
9.3. Apêndice III - Dados brutos do estudo.....	156

RESUMO

PAULA, Hudsara Aparecida de Almeida Paula, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2013. **Efeito prebiótico de produto à base de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na modulação de indicadores da saúde óssea em ratas wistar.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadoras: Hércia Stampini Duarte Martino e Tânia Toledo de Oliveira.

Os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina são compostos alimentares capazes de otimizar a absorção de cálcio. Entre as fontes naturais de frutanos do tipo inulina, tem despertado cada vez mais a atenção da comunidade científica, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) que é uma raiz tuberosa de origem andina considerada, na atualidade, a maior fonte vegetal principalmente de FOS. Neste sentido, foi desenvolvido no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa um produto a base de yacon (PBY) (INPI: 014110002964). Este estudo constitui-se no primeiro, até então, reportado na literatura sobre o efeito prebiótico do PBY na modulação de biomarcadores da saúde óssea de ratas adultas intactas, ovariectomizadas e não ovariectomizadas. Objetivou-se avaliar o efeito do PBY na modulação de variáveis cecais (peso do ceco, pH, ácidos orgânicos); da absorção intestinal de cálcio; da retenção de minerais nos ossos; de marcadores bioquímicos séricos do metabolismo ósseo; da densidade mineral óssea e de propriedades biomecânicas na cabeça e na diáfise do fêmur. Por meio de um pré-experimento foram testadas diferentes doses e definida a de 6% de FOS/inulina do PBY para ser utilizada. O estudo consistiu de três fases distintas. Na primeira fase do estudo (90 dias), em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), foi administrado aos animais dieta de crescimento AIN-93G com e sem PBY; na segunda fase, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para retirada de ovário (ovariectomia - OVX) ou submetidos à simulação de retirada do órgão (celiotomia - SHAM), e na sequência houve suspensão dos tratamentos “*Wash out*” de quatro semanas para recuperação. Na terceira fase do estudo (60 dias) administrou-se a dieta AIN-93M com e sem PBY. Os animais foram alocados em 4 grupos (n=16), por DIC em arranjo fatorial 2² para os dois fatores cirurgia e dieta, em dois níveis: Cirurgia (com e sem ovário), Dieta (com e sem produto a base de yacon). As

análises estatísticas foram realizadas no software SAS[®]. Considerou-se um nível de significância de 5%. O protocolo do estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa com animais da Universidade Federal de Viçosa, parecer nº 55/2011. Os resultados obtidos na primeira fase do estudo indicaram efeitos clínicos promissores em relação a maior produção de acetato e lactato; a menor excreção de cálcio fecal; e maior absorção aparente fracional, maior absorção aparente percentual, maior balanço mineral e maior percentual de retenção de cálcio. Estes resultados presumem impacto positivo, a longo prazo, no metabolismo ósseo. Ressalta-se que as ratas na fase 1 do experimento encontravam-se “intactas” sem serem expostas a nenhum procedimento invasivo, o que justifica as pequenas variações biológicas observadas nas variáveis mensuradas, em contraste com o que foi verificado na fase 2 do estudo. Na segunda fase observou-se maiores concentrações de acetato e lactato no grupo que recebeu a dieta PBY tanto nas ratas ovariectomizadas (sem ovário) quando nas ratas celiotomizadas-SHAM (com ovário) ($P < 0,05$). De forma coerente foi observado maior percentual de retenção mineral e balanço mineral de cálcio no grupo OVX que recebeu o PBY comparado ao grupo OVX que não o recebeu na dieta. Os níveis séricos do marcador de reabsorção óssea (Telopectídeo Aminoterminal do colágeno tipo I - NTx) foram menores nos animais que receberam o PBY na dieta ($P < 0,05$) e os níveis séricos do marcador de formação óssea (Fosfatase alcalina) foram maiores nos animais do grupo PBY ($P < 0,05$), expressivamente nos animais OVX. As propriedades biomecânicas (nas ratas OVX e SHAM) tanto da cabeça do fêmur quanto da diáfise femoral apresentaram valores percentuais maiores no grupo PBY, o que pressupõe efeito favorável na resistência óssea. O PBY apresentou um efeito mais pronunciado em situações na qual os animais encontravam-se em um processo regenerativo decorrente da queda de estrogênio, o que por si só é um resultado interessante e inovador, deixando boas expectativas quanto a problemática investigada. Conclui-se que o PBY modulou favoravelmente o metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas e pode ser considerado uma alternativa promissora para atenuar os efeitos deletérios no metabolismo ósseo advindos da osteopenia em modelo animal.

ABSTRACT

PAULA, Hudsara Aparecida de Almeida Paula, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June, 2013. **Prebiotic effect of Yacon-based product (*Smallanthus sonchifolius*) in modulation of bone health indicators in Wistar rats.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino and Tânia Toledo de Oliveira.

Fructooligosaccharides (FOS) and inulin are food compounds able to optimize calcium absorption. Among natural sources of fructans of inulin type, one has attracted increasing attention from the scientific community, the yacon (*Smallanthus sonchifolius*) which is a tuberous root of Andean origin considered, nowadays, the major vegetable source, mainly FOS. Regarding this, a yacon-based product (YBP) (INPI: 014 110 002 964) was developed in the Department of Food Technology at Federal University of Viçosa. This study constitutes the first, so far, reported in literature about prebiotic effect of PBY in modulation of biomarkers of bone health in intact adult rats, ovariectomized and non-ovariectomized. This study aimed to evaluate the effect of PBY in modulation of cecal variables (cecal weight, pH, organic acids); intestinal absorption of calcium, mineral retention in bones, serum biochemical markers of bone metabolism, bone mineral density and biomechanical properties in head and shaft of the femur. Through a pre-experiment different doses were tested and 6% FOS / inulin dose of YBP was set to be used. The study consisted of three distinct phases. In the first phase (90 days) by Completely Randomized Design (CRD) the growth diet AIN-93G was administered to the animals with and without YPB; in the second phase, the animals undergone surgery for removal of ovaries (ovariectomy - OVX) or undergone to simulated organ removal (celiotomy - SHAM), following suspension of "Wash out" treatments over four weeks for recovering. In the third phase of the study (60 days) the diet AIN-93M was administered with and without YPB. The animals were divided into 4 groups (n = 16), by CRD in 2² factorial design for the two factors surgery and diet, in two levels: Surgery (with and without ovarian), diet (with and without yacon-based product) . Statistical analyzes were performed by SAS[®]. A significance level of 5% was considered. The study protocol was previously approved by the Ethics Committee for Animal Research of Federal University of

Viçosa, opinion nº. 55/2011. The results obtained in the first phase of the study indicated promising clinical effects in relation to the higher production of acetate and lactate; the lower fecal calcium excretion, and higher fractional apparent absorption, higher percentage apparent absorption, higher mineral balance and higher percentage of calcium retention. These results assume positive impact, in long-term, in the bone metabolism. It is noteworthy that rats in phase 1 were "intact" no being exposed to any invasive procedure, which explains the slight biological variations observed in the variables measured, in contrast to the observed in phase 2. In the second phase, higher concentrations of acetate and lactate were observed in the group that received YPB diet in both ovariectomized rats (without ovary) and celiotomized-SHAM rats (with ovary) ($P < 0.05$). In a consistent manner, a higher percentage of mineral retention and mineral balance of calcium was observed in the OVX group receiving YPB, compared to the OVX group that did not receive the diet. Serum marker of bone resorption (amino-terminal telopeptide of type I collagen - NTx) were lower in animals receiving YPB in the diet ($P < 0.05$) and serum marker of bone formation (alkaline phosphatase) were higher in animals of YPB group ($P < 0.05$), significantly in OVX animals. Biomechanical properties (in OVX rats and SHAM) both head and shaft of the femur showed higher percentage values in YPB group, presupposing favorable effect on bone strength. YPB presented a more pronounced effect when the animals were in a regenerative process due to the decline of estrogen, which is an interesting and innovative result, allowing good expectations about the investigated issue. It is concluded that YPB favorably modulated bone metabolism in ovariectomized rats and can be considered a promising alternative to attenuate the deleterious effects on bone metabolism arising from osteopenia in animal models.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais foram introduzidos no mercado mundial no final da década de 1980 (Arai, 2002) tendo como uma de suas características a potencialidade de reduzir o risco de doenças crônicas (FAO, 2007), entre elas a osteopenia e osteoporose.

Diante do processo contínuo de envelhecimento da população mundial, a osteoporose é uma doença de elevada prevalência na terceira idade, notavelmente entre as mulheres, com repercussões expressivas em relação à morbidade e mortalidade, sendo assim considerado um problema de saúde pública. No Brasil esta prevalência é de aproximadamente 33% (Pinheiro et al., 2010).

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa de origem andina, fonte de compostos bioativos como inulina e frutooligossacarídeos (FOS), os quais apresentam efeitos promissores potenciais no metabolismo ósseo.

Esta raiz representa uma alternativa promissora quando comparado a fontes tradicionais de FOS, como a chicória (*Cichorium endivia*) e alcachofra (*Helianthus tuberosus*), pois é a fonte vegetal natural com maior conteúdo deste composto bioativo. Os produtos comerciais atualmente utilizados como prebióticos para tornar os alimentos funcionais são geralmente purificados e isolados das fontes tradicionais mencionadas, sendo os mesmos dispendiosos. O fato da raiz de yacon carrear uma quantidade expressiva de FOS e poder ser consumida *in natura* facilita a sua popularização como alimento funcional direcionado para diminuir os riscos de vários tipos de complicações clínicas, incluindo aquelas relacionadas à saúde óssea.

Porém, a vida de prateleira da planta é limitada devido ao elevado conteúdo de água sendo que *in natura* não é possível encontrá-lo durante todo o ano. Assim, nesse estudo foi desenvolvido um produto à base de yacon - PBY (número de registro de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI: 014110002964). O PBY é mais estável quimicamente e de armazenamento prolongado, sem alterações significativas no perfil de carboidratos, favorecendo assim acesso contínuo a esta fonte de prebióticos.

Nesta linha, este estudo tem perfil inovador voltado a análise da intervenção dietética com PBY, em ratas ovariectomizadas (modelo artificial de menopausa) e intactas e o efeito em diferentes indicadores da saúde óssea.

O conhecimento dos efeitos e mecanismos de ação do yacon sob a forma de PBY, na saúde óssea, permitirá o seu direcionamento para o uso como alimento funcional com efeito benéfico no metabolismo ósseo, o que poderá justificar o maior incentivo à incorporação do PBY aos hábitos alimentares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a food with multiple functions*

* Artigo de revisão aceito para publicação na revista *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*



You are logged in as: Hudsara Paula | Sign out | Change Password

Taylor & Francis

Central Article Tracking System

Articles in Production

Published Articles

Frequently Asked Questions

Author Services

Article Requirements

Additional Actions

This page lists key information and actions that are required for publication. Other options you may need for this article are listed in the "Additional Actions" area (top right tab).

Yacon (*Smallanthus Sonchifolius*): a food with multiple functions
(ID: 645259 DOI:10.1080/10408398.2011.645259)

Journal: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Download Current Citation: [RIS BibTex](#))
Authors: Hudsara Paula, Monise Abranches & Célia Lúcia Ferreira

A copyright agreement licensing us to publish this article has been received and approved.

Copyright Supplied

This article is not yet ready for Proofreading.
Please check back 27 Jun 2013

The Production Editor for this journal is Kerry Stanley. ([Contact Production Editor](#))

ABSTRACT

Functional foods are the focus of many studies worldwide. This is justified by the effects they have on public health and thus interest in elucidation of the mechanisms involved in their actions. The present review aims to broaden the discussions of the functional properties attributed to yacon (*Smallanthus sonchifolius*), considered a food with multiple functions since it possesses bioactive compounds (antimicrobial, antioxidant and probiotic substances) that exert beneficial effects on the body. Although some studies have already demonstrated several of these functions, clinical evidence is scarce, making it necessary that more studies are conducted in this area. Still, since the availability of this food in the market is relatively new, its popularity depends on publications aimed at consumer education and development of new products by the food industry.

Keywords: functional food, yacon, prebiotic, insulin-type fructans, antioxidant, antimicrobial

Introduction

The beneficial effects of many foods are primarily known as a result of observing the eating habits of the oriental population, who present reduced incidences of several non-communicable chronic diseases (breast cancer, osteoporosis, cardiovascular diseases). However, recent scientific interest is in elucidating the food components responsible for such actions and mechanisms by which they act [1, 2]. The term "functional food" was introduced in Japan in the mid-80's with use of FOSHU, an acronym for *Food for Specific Health Use* [3]. This terminology refers to all foods similar in appearance to conventional foods, which contain biologically active components and when consumed as part of a regular diet, can produce physiological benefits with the potential to reduce the risk of chronic diseases in addition to their basic nutritional functions [4].

The search for this type of food has attracted attention not only from the scientific community but also from the public, who desire to maintain healthy nutritional status and reduce the risk or delay the onset of diseases. Given the growing interest for this type of product, a scenario of increased demand and consequent development of new products by the food industrial has been created.

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), considered a functional food, has been grown for centuries by pre-Hispanic people for their subsistence. Its use has been overlooked until the mid 80's, when peculiarities were found in its chemical composition that could be beneficial to human health. Since then, findings and disclosure of its properties have stimulated its marketing [5]. Considering this emerging interest, past and present data obtained on this root should be published and made available to the public. Therefore, the objective of the present review is to broaden discussions on functional properties attributed to yacon, and for this purpose the major scientific studies published so far will be used to validate the benefits that yacon has on health.

General information on Yacon

Origin and production

Yacon belongs to the family Asteraceae and is native to South America, specifically the Andean valleys of Colombia, Ecuador, Peru, Bolivia and

northwestern Argentina. Traditionally it is grown at altitudes from 2,000 to 3,100 m. Maturity is reached between 6 and 12 months after planting when flowering begins and plant height can reach 1.0 to 2.5 m [6].

Cultivation of yacon occurs in different countries for food and medicinal uses [7-10]. This migratory route began in the 1960s, when it was transported from Ecuador to New Zealand. In 1985, it was taken from New Zealand to Japan where the first studies were performed to determine its chemical composition and beneficial effects on health. From Japan yacon arrived in Brazil (1989) [9, 11], brought by Japanese immigrants. Currently, it is also cultivated in Central Europe, particularly in the Czech Republic [12].

Physico-chemical and sensory characteristics and implications of conservation techniques

The word yacon is derived from the Quechua Indian language, meaning Yakku “tasteless” and Unu “water”, but each country may present its own derivations. In Brazil it is known as the yacon potato or *diet* potato, in Peru and Ecuador is named aricama or jicama, and in the United States is called yacon strawberry [8].

Table 1 shows the chemical composition of yacon *in natura* according to data compiled from different studies. It is observed that the root presents low concentrations of micronutrients such as calcium, phosphorus and iron, and considerable amounts of potassium and vitamin C. Among macronutrients, carbohydrates stand out given their high concentration, but it is noteworthy that the total fiber may represent about 30% of these carbohydrates. When considering total fiber, it is observed that the oligosaccharide content (which corresponds to a portion of soluble fiber) may reach 46%. Thus, its composition is primarily composed of water and carbohydrates which are principally stored in the form of fructooligosaccharides (FOS) and other free sugars.

Variations observed in contents of the root depend on different factors such as cultivar, planting altitude, post-harvest storage conditions, and especially the methodology used for quantification of these substances.

Table 1. Chemical composition of yacon *in natura* (g/100g)

Component	Grau and Rea [13]	Manrinque et al. [14]	Hermann et al. [15]	Lachman et al. [16]	Santana and Cardoso [17]	Vasconcelos et al. [18]
Carbohydrates	nd	nd	9-13	13.8	nd	5.51
Oligosaccharides	nd	nd	nd	nd	nd	1.89
Proteins	0.4-2.0	0.1-0.5	2.7-4.9	1.0	nd	0.13
Lipids	0.1-0.3	nd	0.112-0.464	0.1	nd	0.01
Moisture	70-93	85-90	nd	81.3	nd	91.10
Total fiber	0.3-1.7	nd	3.1-4.1	0.9	nd	2.95
Ash	0.3-2.0	nd	4.3-6.0	1.1	nd	nd
Potassium	nd	0.185-0.295	0.180-0.290	0.334	nd	nd
Calcium	0.023	0.006-0.013	0.056-0.131	0.012	nd	nd
Phosphorus	0.021	nd	0.182-0.309	0.034	nd	nd
Iron	0.0003	nd	nd	0.0002	nd	nd
Retinol	0.010	nd	nd	nd	nd	nd
Carotene	0.00008	nd	nd	0.00013	nd	nd
Thiamin	0.00001	nd	nd	0.00007	nd	nd
Riboflavin	0.0001	nd	nd	0.00031	nd	nd
Niacin	0.00033	nd	nd	nd	nd	nd
Ascorbic acid	0.013	nd	nd	0.005	nd	nd
Tryptophan	nd	nd	nd	nd	0.00146	nd

nd= not determined.

Despite scientific references citing that inulin is the main carbohydrate in the root, it is important to note that in yacon FOS is predominant. The difference between FOS and inulin resides in the number of fructose molecules that make up the polysaccharide chains. In inulin this number varies from 20 to 60, while in FOS, whose chains are shorter, there are between 2 and 10 fructose molecules (Figure 1). This means that the FOS can be considered a subgroup of inulin, which is why some authors prefer the term inulin-type fructooligosaccharides to refer more precisely to the nature of these sugars [6, 9, 19]. Inulin and FOS are also denominated inulin-type fructans, a generic term used to describe oligo or polysaccharide prebiotics in which the glycosidic bond fructose-fructose $\beta(2-1)$ predominates [20, 21] (Figura 1). Considering the chemical structure of these soluble fibers, during the human digestive process the hydrolytic enzymes are not able to cleave the $\beta(2-1)$ bonds.

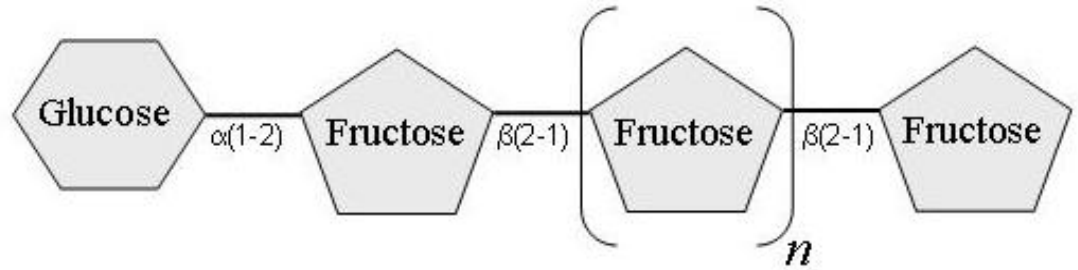


Figure 1. Representation of the structure of inulin-type fructans (n may vary from 2 to 10 or 2 to 60).

The FOS present in the root are non-reducing sugars and present the advantage of not being susceptible to the Maillard reaction. Regarding stability, these compounds are stable at pH greater than 3 and at temperatures up to 140 °C. Thus, FOS are not degraded in most thermal processes used in the food industry [17], an important factor in the development of new products.

The shelf life of yacon is limited due to its high water content [22]. Additionally, yacon has been reported as a good source of the phenol oxidase enzyme, which catalyzes the oxidation of phenolic compounds. Upon peeling the root suffers rapid browning when its tissue is exposed to air. This is because during removal of the outermost plant tissues the cell membranes are disrupted and the polyphenols and tannins found inside the outer skin are available to mix with other components, mainly cytoplasmic enzymes, which can cause the process known as enzymatic oxidation. This oxidation occurs in the presence of free oxygen, which causes the freshly cut surface of the yacon root to brown quickly, making it and its products visually unattractive. Control of this browning is usually limited to enzyme inhibition, which occurs via condensation of polyphenols with amino compounds and polymerization of polyphenols. Methods proposed for the prevention of oxidation are: dehydration, low temperature storage, use of antioxidants and removal of oxygen from the medium [17, 23, 24]. These processes are simple alternatives that ensure chemical stability without significant changes to the carbohydrates profile [22]. Other factors that influence the composition of yacon roots are the cultivar, seasons of planting and harvesting, as well as time and temperature of storage [6, 9, 25].

Despite its Andean origin, yacon is a species highly adaptable to different climates (develops in regions with temperatures ranging from 0 °C to 24 °C), altitudes (800 to 2,800 m above sea level) and soil types [6, 17]. However, at lower altitudes, maturity is early. This stage is then followed by a period in which oligofructan content in the rhizophores and tuberous roots increases [17].

In the Andean region, yacon can be harvested throughout the year in well watered and frost free soils. On the other hand, there are areas with only one growing season where planting is performed at the beginning of the rainy season [6].

Regarding the time and temperature of storage, upon harvest of the root they become independent units and therefore chemical and biochemical transformations play an important role in energy production for the respiration and transpiration processes [17]. The energy required to meet metabolic demands of the root are provided by depolymerization of the stored inulin-type fructans chains. Thus, after harvest there is rapid alteration in the chemical composition of carbohydrates in which polymerized sugars tend to depolymerize as the post-harvest time increases, i.e., fructans are hydrolyzed to di- and monosaccharides by action of the enzyme fructan hydrolase (FH), which converts fructans into sucrose, fructose and glucose. The enzyme invertase can then act on this substrate (sucrose molecules), to produce free fructose and glucose [26].

After a week of storage at room temperature (25 °C), about 30% to 40% of FOS are converted into simple sugars [27]. However, according to Manrique et al. [6], the speed of this conversion is slower if yacon is stored under refrigeration (approximately 4 to 10 °C), and this condition also aids to reduce the rates of roots decay and deterioration during storage. Due to depolymerization of accumulated fructans after harvest it is very important to establish a post-harvest management routine that seeks to minimize changes in the content and distribution of carbohydrates in order to prolong shelf life. It appears that greatest content of oligofructanos is guaranteed when the roots are immediately processed after harvest or refrigerated [6]. These measures allow for greater conservation and stabilization of oligofructanos.

Popular use

The yacon root has a sweet flavor and crunchy texture, similar to a combination of apple and watermelon [28], and can be eaten raw, boiled (in the form of soup), roasted, dehydrated, in beverages [8,29] or processed [22] in the form of jam [30], syrup [6], vinegar [31], flour [11, 32], chips (dried yacon cut into slices) and juice [17]. In Japan, the tuberous roots are transformed into bakery products, fermented beverages, freeze-dried powder or pulp, pickles and other products [17].

In the region of Cajamarca, Peru, yacon is used as an antirachitic food. Andean folk medicine claims that the roots act as a remedy for liver and kidney diseases. In Bolivia, the root is consumed by people with diabetes and digestion problems. Andean farmers also consider it a skin rejuvenator, and according to one popular version, the residents of Cajamarca eat yacon before bedtime to slow aging. The aerial portion of the plant is used for preparation of medicinal teas, where studies have shown that tea made from the leaves presents hypoglycemic and hypocholesterolemic activities [8, 33].

The subterranean organs of yacon which contain 60 to 70% fructans in the form of inulin-type FOS can be used in the manufacture of dietary products and baby food, the production of fructose syrup, a sugar of great interest to the food industry [8], and also used in veterinary medicine to effectively counter digestive disorders in cattle [9].

It is interesting that literature does not report potential toxic effects of yacon [22, 34, 35], where it is assigned to historically safe use in South America and other regions [36] with the exception of the work of Yun et al. [25], who reported the first case of anaphylaxis after ingestion of yacon roots by a 55 year old Korean woman. This woman was treated in the hospital for developing generalized urticaria, pruritus, and coma within 5 minutes of ingesting yacon roots. Skin tests were carried out with juice extracted from the yacon root and results presented 3.5 x 4.0/positive reaction to histamine, negative reaction to saline and 4.5 x 7.0/positive reaction to yacon juice. There were also reports of tingling, pain and numbness in the oral cavity and around the lips about 5 minutes after ingestion of 2 g of the yacon root. Oral susceptibility testing was interrupted because the patient complained of chest tightness and dizziness.

Functional properties of yacon

Bioactive compounds

All food substances (nutrients or not) present in unmodified food or added to a carrier food are considered bioactive compounds [4]. Thus, functional foods can be classified according to the bioactive compounds present [37]. Yacon is a multi-functional food because it contains several bioactive compounds, including: phytoalexins which have antimicrobial activity [38], phenolic compounds that exert antioxidant activity, such as chlorogenic acids [9, 22], and high contents of fructans (inulin and FOS) that have prebiotic properties [34, 35, 39, 40].

Antimicrobial substances

Evidence of the antimicrobial properties of yacon is revealed by the peculiarities of its cultivation: planting of yacon requires practically no pesticides, which suggests that this plant naturally contains antimicrobial substances and insecticides [41]. Different antimicrobial compounds have been identified in the leaves of yacon. Inoue et al. [38] isolated four antifungal agents from extracts of yacon leaves: sonchifolin, polymatin B, and uvedalin enhydrin. These authors found that sonchifolin presented high fungicidal activity against *Pyricularia oryzae*, a fungus which causes disease in rice paddies. Lin et al. [41] isolated six antibacterial compounds from yacon leaves, and among the six sesquiterpene lactones, one presented potent antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and *Pyricularia oryzae*.

Antioxidant substances

When compared with other tuberous roots, yacon contains a high concentration of polyphenols, about 200 mg/100 g of moist weight [6]. This value is significant because few drinks considered rich in phenolic compounds have similar amounts: coffee (200-500 mg/cup), tea (150-200 mg/cup) and red wine (200-800 mg/cup) [17].

Polyphenols, such as chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$), are chemical compounds with antioxidant properties since they prevent the oxidation of biomolecules by reacting with unstable atoms or molecular structures, such as free radicals [6, 42]. Free radicals come into contact with the body in different

ways, for example, inhalation of tobacco smoke and air pollution, ingestion of toxic substances (pesticides) or may be produced in the body by means of ionizing radiation and even by the cellular metabolism. The cell metabolism is a constant source of free radicals, since about 5% of oxygen, which acts as a final electron acceptor in the mitochondria, is not neutralized with the formation of water. Thus, the highly unstable species derived from oxygen ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot}) act as free radicals. These compounds damage cell membranes by oxidizing lipids and proteins, and as a consequence destroy them and may cause changes in DNA, leading to many health problems, including increased risk of cancer [43]. Free radicals are also associated with cardiovascular diseases because they cause the oxidation of low-density lipoprotein cholesterol particles (LDL-c). When these enter the subendothelial layer by not being degraded, they generate an inflammatory process that amplifies the production of free radicals and as a final result lead to thickening and hardening of the arteries, reducing the arteriolar lumen [6].

Despite the high concentration of polyphenols in the root, much higher quantities are found in the leaves and stem of yacon [6]. Hondo et al. [44] reported that yacon juice contains 850 ppm of phenolic compounds. The most abundant polyphenols in yacon are chlorogenic acid and phenols derived from caffeic acid [6]. Of the five principal phenolic compounds in yacon, three are esters of caffeic acid and two are metabolites of chlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid), phenolic compounds common in plants of the family Asteraceae [45].

Terada et al. [46] showed that yacon roots present strong antioxidant activity and suggested potential benefits of dietary supplementation to reduce the risk of type 2 diabetes mellitus. In this study tricaffeoylaltaric acid was identified as the compound responsible for the most potent antioxidant activity observed.

Probiotic Substances

Different types of fructans are encountered in nature, but from a nutritional standpoint and for use in the food industry FOS and inulin are the most important [6, 9]. While other roots store energy in the form of starch, yacon mainly stores energy in the form of inulin-type fructans [25].

As previously mentioned, the human being does not have enzymes capable of cleaving $\beta(2-1)$ bonds during digestion, thus after consumption inulin and FOS are selectively fermented in the colon by a group of desirable bacteria, most notably those of the genus *Bifidobacterium*. Bifid bacteria improve gastrointestinal operation [47], generating organic acids such as lactate and the short chain fatty acids (SCFA) acetate, propionate and butyrate. Resulting from the synthesis of organic acids, the metabolism of the inulin-type fructans indirectly generates 1.5 to 2.0 kcal.g⁻¹ for the host [34, 48, 49].

Favorable effects associated with the fermentation of inulin and FOS in the colon include increased absorption of certain minerals such as calcium and magnesium due to decreased pH and consequent solubilization of complex salts [6, 39, 50, 51]. These minerals are essential components of hydroxyapatite crystals [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] present in the bone structure [52], contribute to reduction of cholesterol levels [6, 9] and inhibit the production of toxins and carcinogens in the colon [6].

FOS and inulin may even modulate the physiology of the intestine similarly to dietary fiber by increasing bowel movements, reducing intestinal transit time and promoting water retention in stools (similar to the osmotic action of laxatives). Together these effects can control and reduce the risk of constipation [6, 53].

Serving as a fermentative substrate for bifidobacteria, one of the major groups of probiotic bacteria [47], FOS and insulin beneficially modulate the intestinal microbiota [4]. Thus, yacon may be considered prebiotic. Through fermentation and consequent growth promotion of microorganisms beneficial to intestinal health, prebiotics are able to change the composition and functionality of the microbial population. They assume this role not only to facilitate the exclusion of potential pathogens by competition, but also to modulate the immune system, increasing defenses of the host [51, 54, 55].

Probiotics are considered live microorganisms which when present in adequate amounts provide health benefits to the host [56]. Consumption of yacon is a way to stimulate the growth of these microorganisms in the colon. An *in vitro* study evaluating the fermentative capacity of three probiotic strains (two lactobacilli and one *bifidobacterium*) on FOS from yacon roots and commercial FOS revealed that all were able to ferment FOS from the yacon root [47]. These bacteria produce the intracellular enzyme fructosilfuranosidase necessary for

hydrolysis of $\beta(2-1)$ bonds in fructans [20]. An example of the influence of FOS on intestinal microbiota is found in the clinical study conducted by Guigoz et al. [57]. The authors found an increase in bifidobacteria counts in the feces of elderly individuals who received 8 g of FOS in the diet/day, consumed for 3 weeks. The bifidobacteria count increased on average $2.8 \pm 0.57 \log_{10}$ CFU/g feces after 3 weeks of supplementation and decreased on average $1.1 \log_{10}$ CFU/g of feces after a period without FOS, confirming the bifidogenic effect of FOS in this population group.

Increase in the number of bifidobacteria leads to greater competition with pathogenic bacteria for binding sites in the intestinal epithelium and competition for nutrients, inhibiting survival of harmful strains. Probiotic species are also capable of producing metabolites such as acids and bacteriocins which act as pathogen antagonists [58]. An example of this is *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp., originating from the human intestinal microbiota and producing antimicrobial substances that are active *in vitro* and *in vivo* against enterovirulent microorganisms involved in disorders such as diarrhea [59]. Studies such as this reinforce the principle that probiotic bacteria can be used in therapeutic strategies for the control of human diseases [60].

In addition, De Simone et al. [61] suggested that microbial substances, such as cell wall components and cytoplasmic antigens may cross the intestinal epithelium through M cells, resulting in the presentation of antigens to lymphocytes in the Peyer's patches and therefore activation of the immune response. Specific T lymphocytes expand, mature and together with other components of the immune system amplify the synthesis of cytokines which contribute to defend the host and protect the intestinal surface [62, 63].

Besides the action of T lymphocytes there is also the production of antibodies, specifically secretory immunoglobulin A (IgA) by differentiated B lymphocytes. Antibodies are transported across the epithelial layer toward the intestinal lumen. In the intestinal lumen, these antibodies react with specific antigens to prevent physical interaction of harmful agents (such as bacteria) with the intestine surface. This process is called immune exclusion and prevents the activation of inflammatory reactions that may damage the integrity of the mucosal surface. Therefore, probiotics are involved in local defenses, since they prevent colonization of the intestine by pathogens [63, 64] and can serve to constantly stimulate the production of IgA. Lomax and Calder [65]

compiled information from 21 studies with laboratory animals to suggest that aspects related to innate and adaptive immunity of the intestine, as well as systemic immunity, are affected by inulin-type fructans. This category of prebiotics is able to improve the ability of the host to successfully respond to intestinal infections and modify certain inflammatory conditions.

In summary, the different functional effects attributed to the consumption of yacon are (Figure 2): laxative [34, 35, 53], hypoglycemic [35, 66], increased mineral absorption, maintained bone health [39, 67], reduced weight [35], reduced cholesterol [6] and triglyceride levels [22], antioxidant [12, 68], antimicrobial [38, 41, 45, 46) and prebiotic [47].

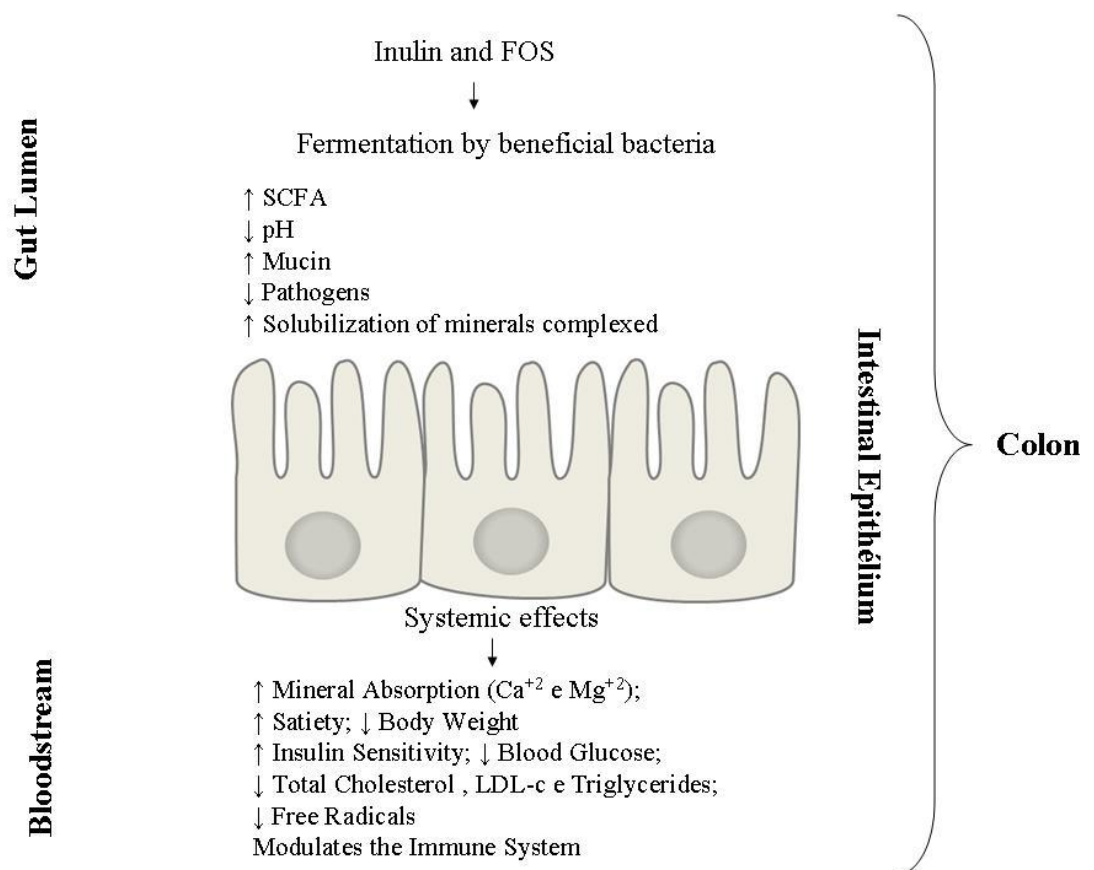


Figure 2. Representation of the functional role of yacon (*Smallanthus sonchifolius*).

SCFA: Short Chain Fatty Acids.

Functional effects of yacon

There are few studies in literature that assess the functional effects of yacon; however, those that are available provide information on the use of this promising food. The principal studies that address the functional properties of yacon are presented as follows.

Studies in animal models

A study with healthy and diabetic *Sprague–Dawley* rats showed that consumption of tea made from yacon leaves can help lower blood sugar, and also have positive effects on renal parameters. Yacon tea (2%) administered *ad libitum* in the place of water for 30 days to diabetic rats increased the concentration of circulating insulin [66]. However, the authors warn that the nature of the chemical component (s) responsible for these effects is not yet known nor are the compound (s) found in yacon roots. It should be noted that this effect is probably not due to the FOS, since its concentration in the yacon leaves is very low [6].

Valentova et al. [12] verified in *Wistar* rats the effects of tea made from yacon leaves on the viability of hepatocytes, oxidative damage, glucose metabolism, as well as its effect on the expression of cytochrome P450. The authors also confirmed the antioxidant, cytoprotective (given the increased activity of cellular detoxification via P450) and anti-hyperglycemic properties.

Another study that reinforces the hypoglycemic action of yacon is that of Baroni et al. [69] in which the effect of consuming yacon leaf extract was investigated on blood glucose levels in diabetic and healthy rats. After 14 days of treatment a decrease in plasma glucose was observed in diabetic and nondiabetic animals that consumed the extract. Genta et al. [22] analyzed the influence of yacon root flour consumption as a dietary supplement (340 mg and 6800 mg FOS/kg body weight/day) on biochemical parameters. The study was conducted with *Wistar* rats, to which the two doses evaluated were offered during 4 months. There was a reduction in serum triglycerides while no gastrointestinal symptoms such as diarrhea or constipation were observed; and analysis of the gastrointestinal tract showed that yacon supplementation resulted in significant enlargement of the cecum, where there is high fermentative activity of bifidobacteria.

Lobo et al. [39] evaluated the balance of calcium and magnesium, density, bone strength, and caecum mucosal morphometry of growing *Wistar* rats fed diets supplemented with yacon flour (5 or 7.5% FOS). The consumption of yacon resulted in a positive alteration of cecal histology, balance of the minerals analyzed and had a positive influence on bone parameters.

Clinical studies in Human Beings

Few studies have evaluated the influence of yacon ingestion in human health; however the encountered results, although modest, are promising regarding the incorporation of this food to consumption habits. An example of this is the work conducted by Geyer et al. [34] who revealed a reduction of intestinal transit time (59.7 ± 4.3 h to 38.4 ± 4.2 h), increased frequency of bowel movement (1.1 ± 0.1 times/day for 1.3 ± 0.2 times/day) and regarding stool consistency, there was a trend towards softer stools. These results were obtained after administration of 20 g yacon syrup/day (equivalent to 6.4 g FOS) for two weeks. Although none of these parameters reached statistical significance, they do indicate the clinical importance of these results.

Valentova et al. [33] evaluated the effect of yacon on lipid and glucose concentrations in the blood of 101 individuals. In the group that received yacon a positive effect was observed on triglyceride (mean reduction of 0.32 mmol/L) and glucose levels in the blood (mean reduction of 0.43 mmol/L), showing no adverse effects.

Genta et al. [35] investigated the tolerance and health benefits resulting from the use of yacon syrup in overweight or obese and mildly dyslipidemic women. Women were divided randomly into three groups: 1 - received yacon syrup containing 0.29 g FOS/kg body weight/day, 2 - received 0.14 g FOS/kg body weight/day and 3 - received placebo syrup. The Body Mass Index (BMI) was significantly reduced in the treated group, where this effect was not observed in the control group. Supplementation increased the frequency of defecation during the trial period by about 3.5 times compared to the placebo group. The most prominent effect observed was that after 120 days of treatment, where levels of fasting insulin and the HOMA-IR index (Homeostasis Model Assessment), an indicator for estimation of insulin resistance, significantly decreased compared to values prior to treatment, and no change was observed in the placebo group. It was noted also that after the intervention

period the groups receiving the yacon syrup presented a tendency for increase calcium concentration in the blood in relation to the initial concentration: 2.59 ± 0.01 vs. 2.21 ± 0.02 mmol/L, $p < 0.05$.

In addition to the beneficial properties mentioned, yacon appears to be a promising alternative to traditional FOS sources, such as chicory (*Cichorium endivia*) and artichoke (*Helianthus tuberosus*) [47]. Yacon is considered the highest plant source of FOS [22, 35] it represents the greatest production of FOS in tons per hectare, compared to Jerusalem artichoke and chicory, and also possesses the greatest fructan content on a fresh basis when compared with traditional sources (Table 2).

Table 2. Production and composition of FOS in different plant species

Plant	T (FOS)/ha	FOS (% of fresh weight)
Artichoke	4.5	10 -15
Chicory	0.9	5 -10
Yacon	5.7	3 -19

T: ton; ha: hectare

Source: Van Loo et al.1995 cited by Haully and Moscatto [70]; Manrique et al. [6]; Oliveira and Nishimoto [71].

Another favorable aspect of this plant is its high productivity. Yield is strongly affected by the planting location and the cultivar. Good management, fertilizer application and use of high quality seeds may lead to increased production [6]. It should also be mentioned that the plant permits for erosion control and has potential use as forage (both the subterranean and aerial portions) [13, 17].

Conclusions

Yacon is a food that has become increasingly more well-known among the population due to disclosure of its therapeutic properties, which appears to involve: laxative effects, hypoglycemic effects, increased mineral absorption and bone health maintenance, weight reduction, reduction of total cholesterol, as well as antioxidant, antimicrobial and prebiotic effects. However further studies are needed on this food to better elucidate its effects, since much of the data reported so far originates from studies in animal models and few studies

involve humans. New knowledge obtained in the clinical field will allow for better scaling of the impact of yacon consumption on human health, since understanding of the effects and action mechanisms involved will allow for its appropriate use as a food with multiple functions.

References

1. Oliveira MN, Sivieri K, Alegro JHA, Saad SMI (2002) Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 38: 1-21.
2. Antunes AEC, Marasca ETG, Moreno I, et al. (2007) Desenvolvimento de buttermilk probiótico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27: 83-90.
3. Sgarbieri VC, Pacheco MTB (1999) Revisao: alimentos funcionais fisiologicos. *Brazilian Journal of Food Technology* 2: 7-19.
4. FAO – FAO Technical Meeting on Prebiotics (2007) Food Quality and Standards Service (AGNS), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), September 15-16. <http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics_Tech_Meeting_Report.pdf> 06.26.2010.
5. Maldonado S, Santapaola JE, Singh J, Torrez M, Garay A (2008) Cinética de la transferencia de masa durante la deshidratación osmótica de yacón (*Smallanthus sonchifolius*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28: 251-256.
6. Manrique I, Párraga A, Hermann M (2005) Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). *Yacon syrup: Principles and Processing*; Lima: Centro Internacional de La Papa.
7. Fernández CE, Lipavska H, Milchl J (1997) Determination of saccharides content in different ecotypes of yacon (*Polymixia sonchifolia* poepp. and *endlicher*) cultivated under conditions of Czech Republic. *Agricultura Tro'pica et Subtro'pica. UniVersitas Agriculturae Praga.* 30: 79-89.
8. Vilhena SMC, Câmara FLA, Kakihara ST (2000). O cultivo de yacon no Brasil. *Horticultura Brasileira* 18: 5-8.

9. Seminario J, Valderrama M, Manrique I (2003) El yacon: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Lima: Centro Internacional de la Papa; Universidad Nacional de Cajamarca; Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. <http://www.cipotato.org/market/PDFdocs/Yacon_Fundamentos_password.pdf>. 06.28.2010.
10. Duarte MR, Wolf S, Paula BG (2008) *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. (yacón): identificação microscópica de folha e caule para o controle de qualidade farmacognóstico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 44: 157-164.
11. Moscatto JA, Prudêncio-Ferreira SH, Haully COM (2004) Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. *Ciênc. Technol. Aliment.* 24: 634-640.
12. Valentova K, Moncion A, de-Waziers I, Ulrichova J (2004) The effect of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts on rat hepatic metabolism. *Cell-Biol-Toxicol* 20: 109-20.
13. Grau A, Rea J (1997) Yacon *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: Hermann M., Heller J. (eds.): *Andean roots and tuberous roots: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon. Promoting the conservation and use of underutilized crops*. IPK, Gatersleben/IPGRI, Rome 174: 199–256.
14. Manrique I, Hermann M, Bernet T (2004) Yacon e fact sheet. Lima, Peru: International Potato Center (CIP). < www.cipotato.org/artc/cipcrops/factsheetyacon.pdf>. 05.19.2011.
15. Hermann M, Freire I, Pazos C (1999) Compositional diversity of the yacon storage root. CIP Program Report 1997e1998. < <http://www.cipotato.org/roots-and-tubers/yacon>>. 05.19.2011.
16. Lachman J, Fernandez EC, Orsak M (2003) Yacon (*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson) chemical composition and use e a review. *Plant, Soil and Environment* 49: 283-290.
17. Santana I, Cardoso MH (2008) Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Cienc. Rural* [online]. 38: 898-905.
18. Vasconcelos CM, Silva CO, Teixeira LJQ, Chaves JBP, Martino HSD (2010) 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. Rev Inst Adolfo Lutz 69: 1-16.
19. Goto K, Fukai K, Hikida J, Nanji F, Hara Y (1995) Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). Biosci., Biotechnol., Biochem. 59: 2346-2347.
 20. Roberfroid MB (2005) Introducing inulin-type fructans. British Journal of Nutrition 93: S13–S25.
 21. Yıldız S (2011) The Metabolism of Fructooligosaccharides and Fructooligosaccharide-Related Compounds in Plants. Food Reviews International 27: 16-50.
 22. Genta S, Cabrera W, Grau A, Sánchez S (2005) Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food Chem Toxicol.* 43:1657-65.
 23. Yabuta G, Koizumi Y, Namiki K, Hida M, Namiki M (2001) Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 2121-2130.
 24. Mayer AM (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* 67: 2318–2331.
 25. Yun EY, Kim HS, Kim YE, Kang MK, Ma JE, Lee GD et al. (2010) A Case of Anaphylaxis After the Ingestion of Yacon. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2:149-152.
 26. Carvalho S (2004) Fructanos en raíces tuberosas de yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poep. & Endl.) expuestas al sol y almacenadas bajo condiciones ambientales. *Agro-Ciencia* 20: 17-23.
 27. Graefe S, Hermann M, Manrique I, Golombek S, Buerkert A (2004) Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Research* 86: 157-165.
 28. Herbal Guides (2011) Anonymous. <<http://herbalguides.com/guides/yacon>> 5. 8.2011.
 29. Anonymus (1989) In: *Lost Crops of the Incas. Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*; The National Academic Press: Washington, DC, p. 124-128.
 30. Prati P, Berbari SAG, Pacheco MTB, Silva MG, Nacazume N (2009) Estabilidade dos componentes funcionais de geléia de yacon, goiaba e acerola, sem adição de açúcares. *Braz. J. Food Technol.* 12: 285-294.

31. Hondo M, Okumura Y, Yamaki T (2000a) A preparation of Yacon vinegar containing natural fructooligosaccharides. *J Jpn Soc Food Sci.* 47: 803–807.
32. Rosa CS, Oliveira VR, Viera VB, Gressler C, Viegas S (2009). Elaboração de bolo com farinha de Yacon. *Ciência Rural* 39: 1869-1872.
33. Valentova K, Stejskal D, Bartek J, Dvorackova S, Kren V, Ulrichova J, et al. (2008) Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: in vivo safety assessment. *Food Chem Toxicol* 46:1006–13.
34. Geyer M, Manrique I, Degen L, Beglinger C (2008) Effect of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Colonic Transit Time in Healthy Volunteers. *Digestion* 78: 30-33.
35. Genta S, Cabrera W, Habiba N, Ponsb J, Carillo IM, Graud A, Sánchez S (2009) Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition* 28: 182-187.
36. Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S (2011) Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology* 22: 40-46.
37. Magalhães MS, Salminen S, Ferreira CLLF, Tommola J (2010) Terminology: Funcional foods, probiotics, prebiotics, synbiotics, health claims, sensory evaluation foods and molecular gastronomy. Turku: Finland.
38. Inoue A, Tamogami S, Kato H, Nakazato Y, Akiyama M, Kodama O, et al. (1995) Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. *Phytochemistry* 39: 845-848.
39. Lobo AR, Colli C, Alvares EP, Filisetti TMCC (2007) 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* 97: 776–785.
40. Gibson GR (2008) Prebiotics as Gut Microflora Management Tools. *Journal of Clinical Gastroenterology* 42: S75-S79.
41. Lin F, Hasegawa M, Kodama O (2003) Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 67: 2154-2159.
42. Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O (2007) Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím. Nova* 30: 441-449.

43. Abranches MV (2009) Vitaminas antioxidantes, citocinas e cancer de mama: um estudo caso-controle. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição. Viçosa-MG, Brasil. 21p.
44. Hondo M, Nakano A, Okumura Y, Yamaki T (2000b) Effects of activated carbon powder treatment on clarification, decolorization, deodorization and fructooligosaccharide content of yacon juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 47: 148-154.
45. Takenaka M, Yan X, Ono H, Yoshida M, Nagata T, Nakanishi T (2003) Caffeic Acid Derivatives in the Roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agric. Food Chem.* 51: 793-796.
46. Terada S, Ito K, Yoshimura A, Noguchi N, Ishida T (2006) The constituents relate to anti-oxidative and α -Glucosidase inhibitory activities in yacon aerial part extract. *Yakugaku Zasshi* 126: 665-669.
47. Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L (2003) Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5278-5284.
48. Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr* 125: 1401-1412.
49. Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L, Roberfroid M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2001; 41(5): 353-362.
50. Lobo AR, Colli C, Filisetti TMCC (2006). Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research* 26: 413-420.
51. Saulnier DMA, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J (2009) Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 135–141.
52. Cashman KD (2007) Diet, nutrition and bone health. *Journal of Nutrition* 137: 2507S-2512S.
53. Chen HL, Lu YH, Lin J Jr, Ko LY (2000) Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *Nutr Res* 20: 1725-33.

54. Berg RD (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in microbiology 4: 430-435.
55. Lomax AR, Calder PC (2009a). Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. Curr Pharm Des. 15: 1428-518.
56. FAO – Report of a Joint FAO/WHO (2002) Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May.
< http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. 06.30.2010.
57. Guigoz Y, Rochat F, Carrier-Perruisseau G, Rochat I, Schiffrin EJ (2002) Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. Nutrition Research 22: 13-25.
58. Gibson GR, Fuller R (2000) Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J Nutr. 130: 391S-5S.
59. Servin AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 28: 405–440.
60. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC (2009) Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis. 15: 300-10.
61. De Simone C, Vesely R, Negri R, et al. (1987) Enhancement of immune response of murine Peyer's patches by a diet supplement with yogurt. Immunopharmacol Immunotoxicol 9: 87-100.
62. Hooper LV, Gordon JI (2001) Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. Science 292: 1115-1118.
63. Liévin-Le Moal V, Servin AL (2006) The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. Clinical Microbiology Reviews 19: 315-337.
64. Romeo J, Nova E, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz Ligia LE, Marcos A (2010) Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and synbiotics in different life-stages. Nutr Hosp. 25: 341-349.
65. Lomax AR, Calder PC (2009b). Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. British Journal of Nutrition 101: 633–658.

66. Aybar M, Sánchez Riera AN, Grau A, Sánchez SS (2001) Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yácon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 125-132.
67. Lobo AR, Cocato ML, Jorgetti V, Sá LRM, Nakano EY, Colli C (2009) Changes in bone mass, biomechanical properties and microarchitecture of calcium- and iron-deficient rats fed diets supplemented with inulin-type fructans. *Nutrition Research* 29: 873-881.
68. Simonovska B, Vovk I, Andrensk S, Valentova K, Ulrichova J (2003) Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A* 1016: 89-98.
69. Baroni S, Suzuki-Kemmelmeier F, Assef SM, Cuman RKN, Bersani-Amado CA (2008) Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44: 521-530.
70. Hauly MC, Moscatto JA (2002) Inulin and Oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. *Semina: Ciências Exatas e Tecnologia* 23: 105-118.
71. Oliveira MA, Nishimoto EK (2004) Avaliação do desenvolvimento de plantas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e caracterização dos carboidratos de reservas em HPLC. *Brazilian Journal of Food Technology* 7: 215-220.

2.2. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): fonte de frutanos prebióticos com perspectivas promissoras na saúde óssea pós-menopausa

2.2.1. Resumo

A contribuição dos alimentos funcionais como o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na homeostase óssea é um tema que não pode ser negligenciado, principalmente ao considerar as evidências científicas que se descortinam. Tem sido proposto que os frutanos tipo inulina, um dos compostos bioativos presentes no yacon, beneficiem a retenção mineral e a densidade óssea, com efeito positivo na resistência à fratura, em trabalhos com animais experimentais. Estudos pré-clínicos mostram-se promissores, mas indicam aspectos que precisam ser ainda melhor explorados. Nessa perspectiva, esta revisão tem por objetivo colaborar com as discussões relacionadas aos aspectos metabólicos e nutricionais do cálcio; a relação entre yacon, frutanos tipo inulina e saúde óssea; modelo animal para osteoporose; tecido ósseo; biomarcadores do metabolismo ósseo e biomacânica do tecido ósseo. Verifica-se a necessidade de um maior número de pesquisas pré-clínicas que esclareçam os mecanismos no trato digestório advindos do consumo do yacon tanto *in natura* quanto na forma processada. Especificamente o seu efeito no metabolismo ósseo, principalmente em modelo animal ovariectomizado, o qual permite avaliar aspectos relacionados a perda óssea com a cessação estrogênica, como observado na mulher na pós-menopausa.

Palavras-chave: osso; pós-menopausa; yacon; frutanos tipo inulina.

2.2.2. Introdução

O aumento da expectativa de vida é um fato evidente no mundo todo. Neste cenário, algumas doenças se tornam mais frequentes no envelhecimento incluindo a osteoporose, uma doença óssea, que afeta principalmente mulheres na pós-menopausa, época em que se acentuam os efeitos do hipoestrogenismo (Lima-Costa e Veras, 2003; WHO, 2010; Legette et al., 2012; Brasil, 2013).

A osteoporose é considerada o distúrbio ósteo-metabólico crônico mais prevalente em populações de meia idade e idosa, que se traduz pela perda progressiva da quantidade de massa óssea do organismo, predispondo o

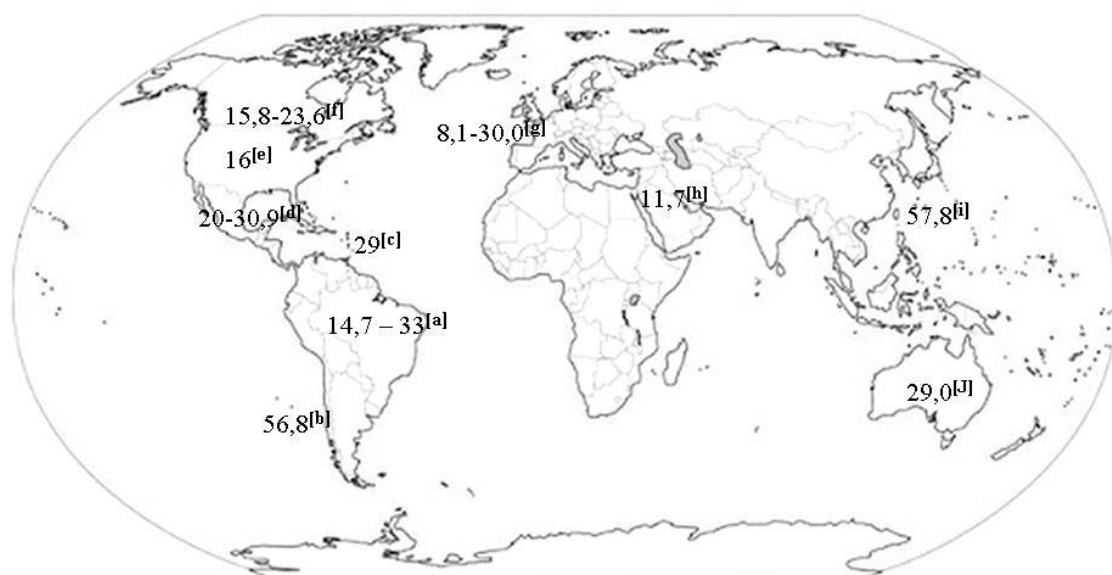
indivíduo ao aumento do risco de fraturas (Genaro e Martini, 2008; Lobo et al., 2009; Won et al., 2011, Brasil, 2013).

Guerra e Prado (2010) identificaram como os principais fatores de risco associados à osteoporose em mulheres, a idade avançada, a raça branca e o baixo índice de massa corporal (IMC).

O decréscimo da absorção intestinal de cálcio está entre as alterações fisiológicas resultantes do envelhecimento que é exarcebado no período pós-menopausa (Kim et al., 2004). Em estudos com animais e humanos, a deficiência de cálcio foi associada com menor formação óssea, concomitante ao incremento na reabsorção (mobilização óssea) e fragilidade óssea (Tahiri et al., 2003; Kim et al., 2004 e Lobo et al., 2007).

Assim, favorecer a biodisponibilidade de cálcio pode auxiliar mulheres na pós-menopausa a diminuir os riscos de perda óssea e conseqüentemente, ocorrência de osteoporose. A osteoporose é considerada a maior causa da redução da qualidade de vida, devido à elevada morbidade e mortalidade, além dos altos custos envolvidos no seu tratamento (Pereira, 2008; Won et al., 2011; Sant'Anna et al., 2012).

Dessa forma, pode-se considerar a osteoporose como a maior síndrome geriátrica da atualidade e um dos grandes problemas de saúde pública mundial (Legette et al., 2012). Na Figura 3 estão indicados valores de prevalência da



^[a] Brasil - Costa-Paiva (2003), Zanette et al. (2003), Pinheiro et al. (2010); ^[b] Chile - Ponce et al. (2002); ^[c] Porto Rico - Haddock (1997); ^[d] México - AMMOM (2000), Cons. Molina et al. (2000); ^[e] Estados Unidos da América - Looker et al. (1997); ^[f] Canadá - Tenenhouse et al. (2000), Fitt et al. (2001); ^[g] Europa - Holt et al. (2002); Curiel et al. (2000); Filip et al. (2001); Smeets-Goevaers et al. (1998); Kullenberg et al. (2003); ^[h] Jordânia - Shilbayeh (2003); ^[i] Taiwan - Yang et al. (2004); ^[j] Austrália - Baheirael et al. (2005).

Figura 3. Prevalência (%) de osteoporose em diferentes regiões do mundo.

osteoporose em diferentes regiões do mundo, de acordo com estudos específicos.

Observa-se uma carência de informações quanto as taxas mundiais de prevalência da osteoporose. O que se encontra na literatura são trabalhos pontuais que subestimam os valores fidedignos da ocorrência de osteoporose nos diferentes países. Como bem destacado por Frazão e Naveira (2006) é necessário implementar projetos para melhor conhecer a prevalência dessa doença, incluindo-a na agenda dos formuladores de políticas públicas. Verifica-se ainda, de acordo com os dados dispostos na Figura 3, que o Brasil apresenta valor expressivo de ocorrência de osteoporose (33%), menor apenas quando comparado ao Chile (56,8%) e Taiwan (57,8%).

Entre os compostos alimentares capazes de otimizar a absorção de cálcio tem-se os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, que são oligo e polissacarídeos prebióticos, respectivamente, em que predominam ligações glicosídicas do tipo frutossil-frutose $\beta(2-1)$, as quais conferem a estes compostos suas exclusivas propriedades estruturais e fisiológicas (Niness, 1999; Kelly, 2009; Yıldız, 2011). O homem e os ratos não possuem enzimas capazes de clivar essas ligações (Roberfroid, 2005) e após consumo, FOS e inulina são seletivamente fermentados no cólon por um grupo de bactérias benéficas, as quais (especialmente os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) melhoram a função gastrointestinal (Pedreschi et al., 2003), gerando ácidos orgânicos como lactato e outros ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico (Gibson e Roberfroid, 1995; Flamm et al., 2001; Geyer et al., 2008).

A microbiota intestinal desenvolve intensa atividade metabólica que lhe permite manter uma relação simbiótica com o hospedeiro. A atividade bioquímica da população microbiana atua como um órgão ativo, que está envolvido em: (i) melhorar a biodisponibilidade de nutrientes, (ii) degradar compostos dietéticos não digeríveis, (iii) fornecer novos nutrientes e (iv) remover substâncias nocivas e compostos antinutricionais. Estas funções metabólicas têm importantes implicações na saúde. No entanto essas ações dependem da composição da microbiota e das complexas interações entre a dieta e o hospedeiro (Tuohy et al., 2003; Sanz et al. 2004).

Diferentes estudos que avaliaram o efeito na modulação da microbiota do colon, e em especial o efeito bifidogênico indicaram resultados favoráveis e significativos, nesse sentido.

Hidaka et al. (1986) avaliaram o efeito da administração de 8g/dia de FOS em humanos, na forma de bebida ou geléia, durante duas semanas. Encontraram incremento médio 10 vezes maior nas contagens de bifidobactérias.

Gibson et al. (1995) observaram que inulina ou FOS quando adicionados em dietas controladas, na razão de 15 g/dia durante 15 dias produziram modificações significativas na composição da microbiota fecal. Nos grupos que receberam tanto FOS quanto inulina os incrementos foram da mesma magnitude.

Pedreschi et al. (2003) demonstraram que os FOS do Yacon foram seletivamente fermentados por *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696 e em, menor proporção, por *Lactobacillus acidophilus* NRRL-1910 e *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496), enfatizando o efeito bifidogênico do FOS.

As evidências científicas têm direcionado que essa categoria de prebióticos apresenta importante implicação na saúde (Coxam, 2005; Roberfroid, 2005), e por isso tem sido os mais intensivamente estudados pelas propriedades de atuar benéficamente na absorção de minerais (Scholz-Ahrens et al., 2007; Legette et al., 2012; Rodrigues et al., 2012) e de melhorar estrutura óssea (Lobo et al., 2006; Cashman, 2007; Lobo et al., 2007 e Saulnier et al., 2009) além da potencial capacidade de atenuar a reabsorção óssea (Weaver et al., 2010; Legette et al., 2012).

No Quadro 3 estão apresentadas informações compiladas de diferentes estudos que indicam o efeito na modulação da absorção de minerais em ratos que consumiram FOS, inulina.

Quadro 3. Estudos, em modelo animal, sobre o efeito na modulação da absorção/retenção de minerais, decorrente da ingestão de frutanos tipo inulina em ratos.

Autores	Substância	Efeitos
Nagendra et al. (1994)	FOS (Produto purificado)	↓ excreção de Ca e Mg; ↑ absorção de Ca
Ohta et al. (1995)	FOS (Produto purificado)	↑ absorção de Fe, Ca e Mg
Ohta et al. (1998a)	FOS (Produto purificado)	↑ absorção de Ca, Mg, Zn e Fe; ↓ excreção de Ca, Mg, Zn, Fe e Cu
Ohta et al. (1998b); Ohta et al. (1999)	FOS (Produto purificado)	↑ absorção de Fe
Lopez et al. (2000)	FOS (Produto purificado)	↑ absorção de Ca, Mg, Cu e Fe;
Sakai et al. (2000)	FOS (Produto purificado)	↑ absorção de Fe nos ratos gastrectomizados
Takahara et al. (2000)	FOS (Produto purificado)	↑ absorção e retenção de Ca e Mg
Scholz-Ahrens et al. (2002)	FOS	↓ perda óssea
Kruger et al. (2003)	FOS+Inulina (Produto purificado)	↑ absorção e retenção de Ca
Coudray et al. (2003)	FOS+Inulina (Produto purificado)	↑ absorção de Ca e Mg
Lobo et al. (2006)	FOS (Produto purificado)	↑ absorção de Ca
Lobo et al. (2007)	FOS + Inulina (Farinha de Yacon)	↑ absorção de Ca e Mg
Lobo et al. (2009)	FOS + Inulina (Farinha de yacon)	↑ absorção de Ca, Fe, Cu, Mg e Zn
Weaver et al. (2010)	FOS + Inulina (Produto purificado)	↑ retenção Ca, Mg, Fe, Cu e Zn
Legette et al. (2012)	FOS + Inulina (Produto purificado)	↑ absorção de Ca
Rodrigues et al. (2012)	FOS + Inulina (Farinha de Yacon)	↑ retenção de Ca, Mg e P

Entre as fontes naturais de frutanos do tipo inulina, tem despertado cada vez mais a atenção da comunidade científica, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) que é uma raiz tuberosa de origem andina considerada, na atualidade, a maior fonte vegetal de FOS (Geyer et al., 2008; Genta et al., 2009; Ojansivu et al., 2011).

À luz destas questões, esta revisão tem por objetivo contribuir com as discussões atribuídas à potencial funcionalidade do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na saúde óssea no período pós-menopausa.

2.2.3. Aspectos metabólicos e nutricionais do cálcio

O cálcio é o quinto elemento mais abundante no corpo humano e possui um papel chave na mineralização do esqueleto e dentes bem como uma ampla

atuação em diversas funções biológicas (Peacock, 2010), tais como mensageiro intracelular (Costa, 2008) e co-fator para enzimas e proteínas extracelulares (Guéguen e Pointillart, 2000), dentre outros.

As mudanças relacionadas ao metabolismo do cálcio com o avançar da idade desempenham função importante no desenvolvimento da osteoporose (Legette et al., 2012). Esse mineral é o substrato essencial para formação da massa óssea e faz-se presente em todas as fases da curva ontogênica de desenvolvimento do esqueleto (Russo, 2001). Por ser o principal constituinte da matriz óssea mineralizada, o cálcio tem sido o mineral mais pesquisado quanto aos seus efeitos no metabolismo ósseo (Guéguen e Pointillart, 2000; Legette et al., 2012).

A vitamina D é outro importante nutriente relacionado com a massa óssea, uma vez que na absorção de cálcio outros fatores são considerados. Apesar de 80 a 90% dos estoques de vitamina D serem provenientes da síntese cutânea, estudos mostram que a deficiência de vitamina D é comum mesmo em países ensolarados (Ohta et al., 1998; Kim et al., 2004).

No organismo animal o colesterol é convertido parcialmente, por uma diidrogenase em 7-diidrocolesterol que é então transformado em colecalciferol (vitamina D) na pele sob a ação dos raios ultravioleta (Franco, 2002).

Essa vitamina tem um papel fundamental na absorção de cálcio, e passa por duas hidroxilações no fígado e rim (Franco, 2002), estando na forma ativa como 1,25 dihidroxivitamina D ($1,25 (OH)_2D_3$). Seu efeito mais notável é o controle da expressão do gene que codifica a calbindina D_{9K} (proteína intracelular envolvida na translocação de cálcio até a membrana basolateral). Com o envelhecimento, o nível da vitamina D pode ser comprometido em virtude da redução da capacidade da pele em sintetizar colecalciferol e redução da capacidade do fígado e rim hidroxilarem a vitamina D em sua forma ativa combinado com a diminuição dos receptores intestinais dessa forma ativa, bem como da responsividade desses receptores. Assim, conseqüentemente, também ocorre o decréscimo da absorção intestinal de cálcio (Slovik et al., 1981; Tsai et al., 1984; Feskanich et al., 2003).

O cálcio é absorvido no trato digestório por uma combinação de transporte ativo e difusão passiva (Figura 4). O componente ativo é saturável, estimulado pela $1,25 (OH)_2D_3$, e ocorre predominantemente no duodeno e jejuno proximal. O processo passivo é mais importante no jejuno distal e no íleo

onde o tempo de trânsito é maior, e pode se tornar o mecanismo predominante de absorção de grandes doses de cálcio, uma vez que o transporte ativo já está saturado e muito pouco ocorre no intestino grosso (Ohta et al., 1998; Guéguen e Pointillart, 2000; Costa, 2008).

A difusão passiva é não-saturável, independente da vitamina D, idade e ocorre ao longo do intestino delgado e grosso. Em idosos a absorção passiva é a rota predominante. Uma variedade de fatores dietéticos, entre os quais prebióticos como os frutanos do tipo inulina, tem mostrado atuação positiva na difusão passiva de cálcio, e esta é uma área promissora de pesquisa que visa produzir uma absorção "extra" desejável (Guéguen e Pointillart, 2000; Coxam, 2005; Roberfroid, 2005), especialmente na terceira idade.

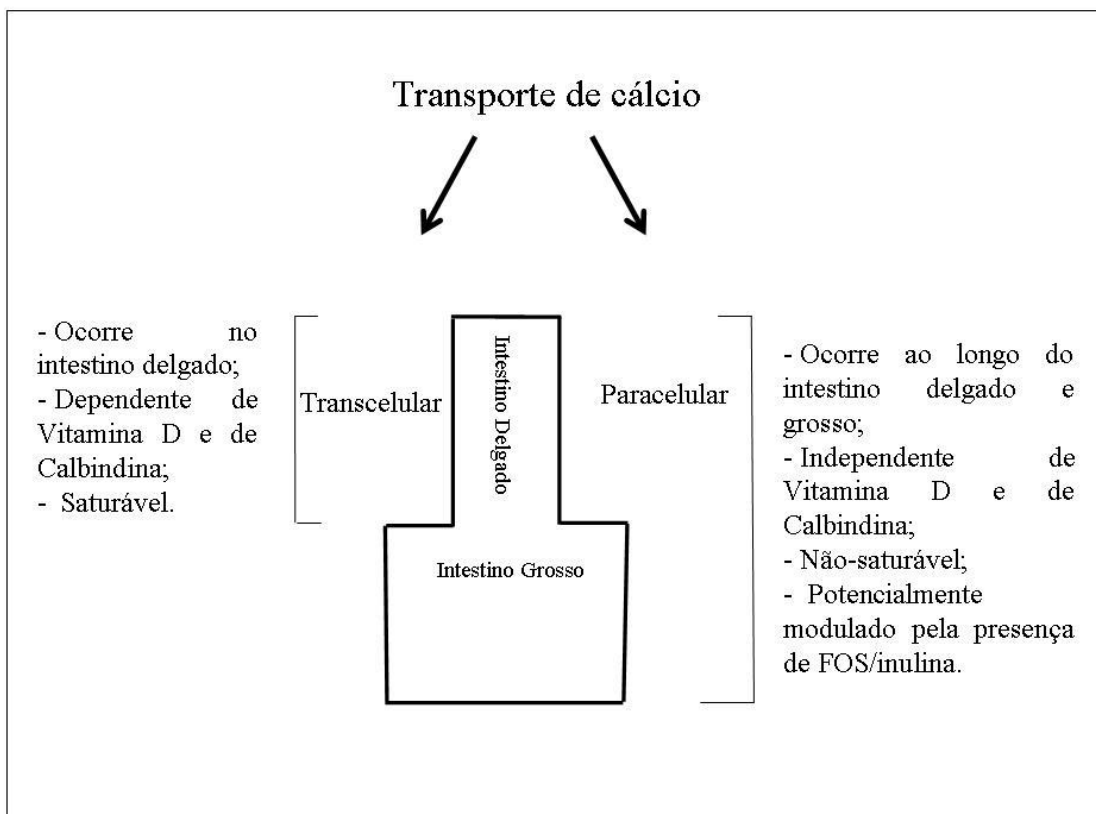


Figura 4. Esquema representativo das características relacionadas a absorção de cálcio.

O estímulo às bactérias benéficas, exercido pelos prebióticos leva ao aumento dos ácidos orgânicos como ácido lático e AGCC, o que por sua vez, como já comentado, favorece o incremento na solubilização do cálcio dietético (Geyer et al., 2008; Weaver et al., 2010), principalmente na região colônica.

Assim, o processo passivo de absorção do cálcio pode ser suscetível à modulação por substratos fermentáveis, como os frutanos FOS/inulina. Dessa forma, estes compostos podem auxiliar na homeostase de cálcio, deslocando o principal sítio de absorção desse mineral para o intestino grosso (Coxam, 2005) em condições específicas, quando o transporte ativo de cálcio está comprometido.

2.2.4. Yacon, frutanos tipo inulina e Saúde Óssea

Em virtude das potenciais funcionalidades do yacon (*Smallanthus sonchifolius*), tem se tornado evidentes o emergente interesse nas pesquisas com esse alimento (Genta et al., 2009; Lobo et al., 2011; Ojansivu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012) e o aumento da sua comercialização.

O número de moléculas de frutose que compõe as cadeias moleculares constitui a principal diferença entre FOS (2-10) e inulina (10-60). Assim os FOS que são oligossacarídeos podem ser considerados um subgrupo da inulina (polissacarídeo), motivo pelo qual é empregado o termo frutanos tipo inulina (Roberfroid, 2005).

Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar o efeito dos frutanos (FOS/ inulina) na saúde óssea:

(i) os FOS estimulam a produção de ácidos orgânicos, como láctico, butírico, propiônico e acético, pelas bactérias do cólon. E desta forma abaixam o pH do conteúdo luminal e solubilizam o cálcio insolúvel presente na forma de fosfato e carbonato, de forma que o conteúdo de cálcio luminal é aumentado e conseqüentemente sua absorção. Aventa-se a hipótese de que o mecanismo envolve calbindina D_{9K} , por meio do aumento da expressão desta proteína envolvida no transporte de cálcio nos enterócitos (Ohta et al., 1998; Kruger et al., 2003).

(ii) outro mecanismo propõe para o efeito de carboidratos fermentáveis na absorção mineral por ambos os transportes, transcelular e paracelular, por meio do incremento da área da superfície absorptiva em resposta a proliferação celular colônica advinda da ação dos ácidos graxos de cadeia curta (Weaver et al., 2010).

O grau de polimerização parece exercer influência sobre a resposta metabólica ao tipo específico de carboidrato não digerível. Em ratos adultos,

Coudray et al. (2003) compararam frutanos tipo inulina com tamanhos diferentes da cadeia do carboidrato. Foi observado efeito sinérgico na absorção de cálcio devido à associação de diferentes graus de polimerização, que por sua vez estimulam diferentes grupos microbianos que apresentam diferentes atividades metabólicas.

É provável que os FOS (2-10 unidades de frutose) sejam mais ativos na parte proximal do cólon, onde podem servir como substrato inicial para a fermentação seletiva por bifidobactérias. Já as moléculas de cadeia longa (10-60 unidades de frutose), que são fermentadas mais lentamente, podem ter efeito no cólon descendente, onde podem manter a atividade metabólica da microbiota benéfica que foi previamente estimulada até as partes mais distais do cólon (Coudray et al 2003; Coxam, 2005). A Figura 5 representa a fermentação dos frutanos tipo inulina nos diferentes compartimentos do cólon.

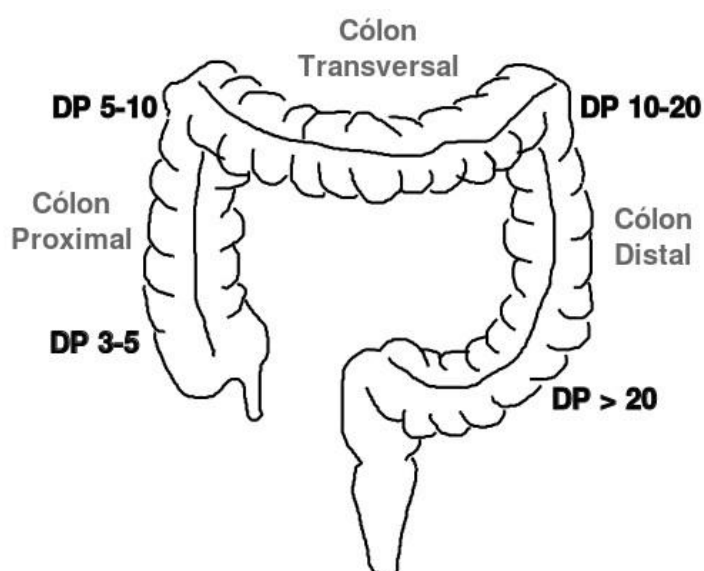


Figura 5 – Fermentação dos frutanos tipo inulina, de acordo com o grau de polimerização (Degree of Polimerization - DP), nos diferentes compartimentos do cólon

Desta forma, a presença de frutanos tipo inulina de cadeia curta e longa mantém a alta atividade fermentativa ao longo do intestino grosso, o que por sua vez, pode incrementar os efeitos benéficos na absorção mineral, visto que aumentando a solubilidade do cálcio a absorção processa-se em todo trajeto do cólon, o que implica em um aproveitamento máximo de toda a superfície da mucosa colônica para a absorção desse mineral (Coudray et al., 2003; Coxam, 2005). Um produto a base de yacon (PBY), desenvolvido recentemente (INPI:

014110002964) contém tanto FOS quanto inulina e assim apresenta propriedade de atuar ao longo de toda a região colônica.

No Quadro 4 encontram-se algumas informações de estudos que avaliaram o efeito de FOS/inulina na saúde óssea. Tais estudos utilizaram modelo animal para osteoporose (ratas ovariectomizadas) ou ratos em crescimento, com doses de FOS e,ou inulina que variaram de 5,0 a 10% na dieta e período experimental de três a 16 semanas. São apresentados os resultados decorrentes das intervenções dietéticas nos grupos.

Nestes estudos, importa notar que os únicos trabalhos que utilizaram o yacon como fonte dos prebióticos FOS e inulina foram os de Lobo et al. (2007;2009) e Rodrigues et al. (2012). Os demais utilizaram FOS/inulina purificados comerciais.

Quadro 4. Estudos em modelo animal sobre efeito de frutanos tipo inulina na saúde óssea.

Autores/Ano	Amostra	Matriz alimentar	Dose (%)	Duração	Resultados
Ohta et al. (2002)	64 ratas OVX	FOS (Produto purificado)	5,2	6	> DMO femural
Scholz-Arhens et al. (2002)	96 ratas OVX	FOS (Produto purificado)	10,0	16	> CMO femural
Kruger et al. (2003)	96 ratos em crescimento	FOS; Inulina; FOS + Inulina (Produto purificado)	5,0	5	> DMO femural; < Excreção dos fragmentos de colágeno tipo I (marcador reabsorção óssea) mais significativamente no grupo Inulina.
Zafar et al. (2004)	26 ratas OVX	FOS (Produto purificado)	5,5	3	> CMO e DMO femural
Lobo et al. (2006)	16 ratos em crescimento	FOS (Produto purificado)	5,0	3	> Retenção de Ca nos ossos; Efeito positivo em propriedades biomecânicas nos ossos.
Lobo et al. (2007)	24 ratos em crescimento	FOS + Inulina (Farinha de Yacon)	5,0 e 7,5	4	> CMO e resistência óssea.
Lobo et al. (2009)	48 ratos em crescimento	FOS (Farinha de Yacon)	10	4	> Resistência óssea; < nº de osteoclastos por área (fêmur e tíbia)
Weaver et al. (2010)	30 ratos em crescimento	FOS + inulina (Produto purificado)	5,0	12	> CMO
Rodrigues et al. (2012)	32 ratos em crescimento	FOS + Inulina (Farinha de Yacon)	4,0	4	> resistência óssea.
Legette et al. (2012)	102 ratas OVX	FOS + Inulina (Produto Purificado)	5,0	4	> produção de AGCC; > peso cecal;

Duração: semanas; OVX: ovariectomizadas; FOS: frutooligossacarídeos; >: maior; <: menor; DMO: densitometria óssea; CMO: conteúdo mineral ósseo; Ca: cálcio; Mg: magnésio; P: fósforo; AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; nº: número.

Até o momento, não há estudos reportados na literatura sobre avaliação da ingestão de yacon na saúde óssea em humanos, o que pode ser justificado em parte pelo fato do yacon ser um alimento que só recentemente tem recebido atenção da comunidade científica e ainda pelo fato consensual de que as condições experimentais com humanos são mais difíceis de controlar. Isso sugere, em um primeiro momento, a necessidade latente de avanço no desenvolvimento de mais estudos pré-clínicos direcionados a este tema e de marcadores mais apropriados e que simulem a perda óssea típica da menopausa.

2.2.5. Modelo animal para osteoporose

O modelo animal se torna cada vez mais apropriado para o estudo da biologia do tecido ósseo, devido às restrições práticas e éticas do uso de seres humanos, oferecendo ainda, maior controle sobre um grande número de variáveis externas (Bennell et al., 2000) e permitindo a caracterização da resposta do osso à intervenção dietética.

Embora a posição quadrúpede do rato difere da posição bípede de humano, as semelhanças da arquitetura da vértebra e fêmur entre eles sugerem que ratos podem ser utilizados na caracterização das alterações ósseas associadas à idade, fatores hormonais e efeitos terapêuticos (Li et al., 2003). Assim, mesmo que não haja um animal que atenda a todos os requisitos de modelo ideal, a rata tem sido amplamente utilizada e aprovada para tais estudos (Mello e Gomide, 2005).

As ratas adultas têm um ciclo regular de estrogênio e sua deficiência causa perda óssea, por isso têm sido o modelo mais utilizado para se estudar o envelhecimento ósseo em humanos (Kalu, 1991). A rata ovariectomizada (OVX) transmite as principais características clínicas da deficiência do estrogênio (Thompson et al., 1995; Otha et al., 2002), pois, como a mulher no período que segue a menopausa, desenvolve osteopenia após ovariectomia (Priemel et al., 2002), ocorrendo aumento do *turnover* ósseo, com a taxa de reabsorção pelos osteoclastos excedendo a formação pelos osteoblastos, levando à perda de massa óssea (Gala et al., 2001), como observados em humanos, reduzindo a força e rigidez do osso levando ao aumento do risco de fratura (Inada et al., 2011).

2.2.6. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo dos mais resistentes e rígidos do corpo, sendo metabolicamente ativo e sofre um processo contínuo de remodelação durante a vida (Roodman, 2012; Brasil, 2013).

O processo de remodelação óssea requer um equilíbrio entre a fase de formação e destruição dando, como resultado, uma renovação da micro arquitetura óssea. Qualquer desequilíbrio neste processo causará alteração da resistência óssea, fato este que ocorre em diversas condições patológicas como a osteoporose pós menopausa, onde a atividade osteoclástica é mais intensa (Carvalho et al., 2001; Brasil, 2013). O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto. Protege os órgãos vitais, aloja a medula óssea, além de proporcionar apoio aos músculos esqueléticos para a movimentação do organismo (Brasil, 2013).

Aproximadamente 70% do osso é constituído por uma fase mineral ou inorgânica, que é representada fundamentalmente pelos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que têm forma alongada e hexagonal, relacionados à resistência à força de compressão e rigidez, associados a uma fase orgânica (20% da massa óssea) constituída principalmente por fibras de colágeno tipo I (90% da proteína), sendo o restante substâncias de adesão e água que atribuem ao osso flexibilidade, elasticidade e resistência à tração (Lobo, 2008; Durán, 2011).

O cálcio pode ser mobilizado da matriz mineral óssea e captado pelo sangue quando há necessidade, para manter os níveis apropriados em todo o corpo, de forma que, além da função de suporte e proteção o tecido ósseo, desempenha um importante papel secundário na regulação homeostática dos níveis sanguíneos desse mineral (Szejnfeld, 2000).

Os principais tipos de células característicos do tecido ósseo são geralmente definidos por sua função ou localização anatômica, (i) osteoblastos, (ii) osteoclastos e os (iii) osteócitos, sendo estes últimos metabolicamente menos ativos (Vieira, 1999; Zerbini e Souza, 2001; Junqueira, 2008; Brasil, 2013).

(i) os osteoblastos são células típicas do tecido conjuntivo, oriundos de uma célula mesenquimal indiferenciada. Sua função básica é a de síntese (formação) do tecido ósseo. Estas células sintetizam o pró-colágeno tipo I, as proteínas da matriz extracelular, a fosfatase alcalina e a osteocalcina,

sendo que já foram identificados nestas células, receptores para estrógeno, progesterona, glicocorticóides, testosterona, estradiol e a Vitamina D3 explicando, com isso, as influências das concentrações destes elementos na formação óssea; (ii) os osteoclastos são células originárias do tecido hematopoiético, sendo derivadas de colônias de células formadoras de macrófagos. Sua função básica é a de reabsorção óssea. Essas células apresentam uma borda irregular que aumenta a sua superfície de contato, aderindo-se assim à área em que será realizada a reabsorção óssea; (iii) os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo, sendo células derivadas do osteoblasto que, uma vez terminada a sua atividade de síntese, recobrem-se de um conteúdo mineral e se situam em cavidades (lacunas). Possuem prolongamentos citoplasmáticos, fazendo uma verdadeira rede de comunicação com outros osteócitos por meio de canaliculos, que se anastomosam com os canaliculos das lacunas vizinhas. São estas células as responsáveis pela manutenção do tecido ósseo vivo, uma vez que detectam as alterações físicas químicas deste tecido recrutando osteoclastos e osteoblastos para as funções de síntese e reabsorção.

Para que haja a integridade do tecido ósseo é necessário um equilíbrio entre a formação e a destruição óssea, ou seja, entre a atividade dinâmica osteoblástica/osteoclástica (Brasil, 2013).

Os dois principais tipos de tecido ósseo são o trabecular (o qual possui uma rede de trabéculas e espaços intercomunicantes, de localização mais central, denominada cavidade medular, que abriga a medula óssea e corresponde a 15% da massa esquelética) e o cortical (tecido compacto que se encontra na periferia dos ossos e corresponde aproximadamente a 85% de toda massa esquelética). Além das diferenças estruturais, os dois tipos diferem também quanto a outros aspectos como a distribuição espacial das células, densidade da matriz mineralizada, distribuição dos vasos sanguíneos e área ocupada pela medula óssea. Os osteoblastos e osteoclastos movem-se sobre a superfície, sendo que os osteoblastos podem estar embebidos na matriz, dando origem aos osteócitos. Em função de sua maior superfície em relação ao volume, o osso trabecular é metabolicamente mais ativo que o cortical (Vieira, 1999; Zerbini e Souza, 2001).

As extremidades dos ossos longos são chamadas de epífises, sendo separadas do restante do osso denominado de diáfise (corpo ósseo) (Brasil, 2013).

O conteúdo mineral ósseo (CMO) e a densidade mineral óssea (DMO) são determinados principalmente pelo genótipo. Aproximadamente 70% da variação na densidade óssea é determinada pela hereditariedade. Portanto os 30% restantes dependem do fenótipo, em que a nutrição representa um dos fatores que podem induzir respostas fisiológicas que permitam níveis mais elevados de obtenção de massa óssea (Vicente-Rodrigues et al., 2008).

Como mencionado, o osso constitui-se num tecido dinâmico que é constantemente renovado. Os processos de formação e reabsorção óssea estão sob o controle sutil de diversos fatores locais e sistêmicos (Rauner et al., 2007), como fatores físicos, fatores de crescimento, hormônios e citocinas (Vieira, 1999; Won et al., 2011). Uma série de condições como idade, doenças ósteo-metabólicas, diminuição de mobilidade, ação de algumas drogas, etc., podem alterar este equilíbrio entre formação e reabsorção, levando ao predomínio de um sobre o outro (Vieira, 1999). Após a menopausa, os marcadores de reabsorção óssea apresentam um incremento maior que os de formação (Fernandes et al., 2010), em decorrência da deficiência estrogênica (Rauner et al., 2007).

O estrogênio exerce influências distintas no corpo pela ação conjunta com seus receptores em vários tecidos, inclusive nos ossos. Em condições anormais, a redução da massa óssea pode representar insuficiência de formação da matriz protéica na qual é depositado o cálcio. A formação da matriz protéica depende de hormônios gonádicos. Quando as concentrações dos hormônios sexuais são inadequadas, o anabolismo protéico é reduzido, enquanto o catabolismo continua sem decréscimo. Com isso a maior suscetibilidade à osteoporose entre as mulheres está associada intimamente à queda da produção de estrogênio que acompanha a menopausa (Kalu, 1991; Turek, 1991).

2.2.7. Biomarcadores do metabolismo ósseo

A avaliação do tecido ósseo pode ser realizada por diferentes métodos incluindo técnicas radiográficas (Cheong et al., 2011), densidade mineral óssea, a qual é um importante referencial da qualidade óssea, que é aferida

pela densitometria óssea, técnica de dupla emissão de raios-X (DXA – Dual Energy X-Ray Absorptiometry) (Carvalho et al., 2012). Já a microarquitetura óssea pode ser avaliada por meio da microtomografia computadorizada (μ CT) que possibilita a reprodução de imagens do tecido ósseo utilizando softwares específicos que permitem mensurações e cálculos em três dimensões por meio da investigação de seu remodelamento (Morgan et al., 2009; Milanetti et al., 2011; Carvalho et al., 2012). Além destes métodos utilizam-se ainda os marcadores bioquímicos de turnover ósseo (Swaminathan, 2001; Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002; Carey et al., 2006), que serão melhor detalhados.

O tecido ósseo é continuamente “formado” e “destruído” por células especializadas. Todo esse processo é chamado de “turnover” (ILSI, 1999).

O *turnover* ósseo é considerado importante tanto na predição da qualidade óssea quanto nas mudanças na densidade óssea (Cheong et al., 2011). Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação (exemplo: osteocalcina e fosfatase alcalina específica do osso), medem produtos decorrentes da ação destas células. Da mesma maneira, os marcadores de reabsorção (exemplo: telopeptídeos aminoterminais do colágeno tipo I – NTx) medem a ação dos osteoclastos, o principal tipo celular envolvido na reabsorção da matriz óssea dos componentes minerais e orgânicos (Vieira, 1999; Swaminathan, 2001; Civitelli et al., 2009).

O paratormônio (PTH) é um hormônio protéico sintetizado pela paratireóide. A ação do PTH se faz diretamente sobre o osso e o rim e, indiretamente, sobre o intestino, elevando o fluxo de cálcio para a circulação. Os receptores de PTH foram identificados no tecido ósseo, nos osteoblastos e seus precursores, as células progenitoras pluripotentes de linhagem mesenquimal (Swarthout et al., 2002). Apesar de não elucidado por completo, admite-se, com base em dados clínicos e experimentais, que as ações mediadas pelo PTH no osso permitem o acoplamento entre osteoblastos e osteoclastos, aumentando o *turnover* ósseo. Essas ações estimulam tanto a formação quanto a reabsorção óssea, sendo que pode ocorrer o predomínio de um ou outro processo (Gracitelli et al., 2002).

Entre os marcadores de formação óssea destacam-se a fosfatase alcalina específica do osso (FAEO) e a osteocalcina. A FAEO é uma enzima presente na membrana das células osteoblásticas. Enquanto a osteocalcina é uma proteína da matriz óssea sintetizada pelos osteoblastos maduros (Vieira, 1999; Vasikaran et al., 2006).

Durante a formação do osso, a produção da matriz colágena precede a mineralização. A fase de produção de matriz colágena coincide com uma maior produção de FAEO, enquanto a mineralização coincide com uma maior produção de osteocalcina (Stein e Lian, 1993).

Quanto aos marcadores de reabsorção óssea, destacam-se as moléculas interligadoras do colágeno. Quando os osteoclastos reabsorvem o tecido ósseo, eles o fazem através da secreção de uma mistura de proteases ácidas e neutras, que agindo sequencialmente degradam as fibrilas colágenas em fragmentos de diferentes tamanhos.

Assim, por ação da enzima lisil oxidase, moléculas de lisina e hidroxilisina da porção terminal (telopectídeos) das moléculas de colágeno formam aldeídos e se condensam com o resíduo de molécula adjacente formando uma estrutura interligadora composta de três radicais hidroxilisina (piridinolina) ou uma lisina e duas hidroxilinas (deoxipiridinolina) (Eastell et al., 1993; Vieira, 1999; Vasikaran et al., 2006; Civitelli et al., 2009). Estes resíduos constituem o mais importante meio de estabilizar a molécula de colágeno por ligações cruzadas intramoleculares. As ligações cruzadas são formadas extracelularmente após a deposição das moléculas de colágeno dentro da matriz extracelular e elas são liberadas do osso apenas durante a reabsorção óssea ou quebra do colágeno (Swaminathan, 2001).

A fosfatase alcalina específica do osso e os telopeptídeos aminoterminais (NTx), séricos, constituem na prática clínica os biomarcadores ósseos mais comumente indicados devido a sua sensibilidade e acurácia.

Outro marcador de reabsorção óssea que pode ser utilizado é a tetraciclina tritiada ($^3\text{H-TC}$). No estudo em modelo animal (ratas ovariectomizadas), Cheong et al. (2011) validaram a tetraciclina tritiada ($^3\text{H-TC}$), comparando ao isótopo ^{41}Ca , como um marcador de *turnover* ósseo, a ser mensurado na urina. A $^3\text{H-TC}$ apresenta menor custo que o ^{41}Ca , mas é restrita ao uso em animais. Após injetada no organismo animal a $^3\text{H-TC}$ é quelada com o cálcio e depositada na apatita do osso, o que finalmente resulta em um

incremento na concentração de $^3\text{H-TC}$ que é depositada no esqueleto. Quando ocorre *turnover* ósseo a $^3\text{H-TC}$ é liberada e excretada na urina e assim como os traçadores de cálcio acredita-se que a mesma proporcione uma medida direta da reabsorção óssea.

2.2.8. Biomecânica do tecido ósseo

O tecido ósseo tem por principal função a formação e manutenção do esqueleto, proporcionando locomoção e proteção (Civitelli, 2009). O esqueleto de um organismo vivo constitui um sistema que suporta cargas e é submetido a um conjunto complexo de forças que causam deformações (Lind et al., 2001), estas podem ser de origem externa ao corpo onde agem ou resultantes do efeito de vários componentes do corpo (Durán, 2011). A biomecânica do tecido ósseo contempla propriedades resultantes do efeito de estímulos mecânicos sobre os ossos.

A osteoporose decorre do aumento desproporcional da reabsorção óssea, devido a supressão do controle inibitório sobre osteoclastos, ocorrendo desequilíbrio no remodelamento ósseo (Garland et al., 1992). Neste sentido, o organismo não consegue fazer o remodelamento ósseo na mesma proporção que ocorre reabsorção, tornando o osso mais frágil e menos capaz de resistir a compressão e à torção, o que aumenta à incidência de fraturas (Carvalho et al., 2001).

O quadro clínico marcado pela redução da massa óssea é associado com uma obrigatória perda de estrutura óssea e, conseqüentemente, diminuição da força óssea. Portanto, a microarquitetura óssea tem importante função em determinar as propriedades mecânicas dos ossos (Carvalho et al., 2001).

O tecido ósseo possui um sistema mecanosensorial ou mecanotransdutor (conversão de estímulo biofísico em um sinal capaz de ser entendido pela célula, a qual obedece uma sequência de acontecimentos) (Duncan e Turner, 1995) que promove adaptação do esqueleto à imposição de diferentes cargas mecânicas de modo que sua arquitetura estrutural é modulada pelo constante estresse ao qual é submetido podendo haver atrofia ou hipertrofia (Doblaré et al., 2004).

O estudo da resistência biomecânica óssea é muito importante para a análise da qualidade de ossos susceptíveis a fraturas (Mello e Gomide, 2005).

A preocupação fundamental com a osteoporose é a de que as propriedades mecânicas dos ossos são comprometidas em um grau que as fraturas ósseas ocorrem sob condições de carga normais, que não são associadas com fraturas em ossos saudáveis (McNamara, 2010).

Vários fatores como o *turnover* ósseo, morfologia, mineralização (Ahlborg et al., 2003) e microarquitetura óssea, danos ao tecido ósseo, excesso de peso e estrutura colagenosa (Friedman, 2006; Carvalho et al., 2012) incidem na resistência óssea e respondem pela natureza multifatorial da mesma. Além disso, contribui em diferentes graus para criar as propriedades dos materiais que permitem ao osso suportar as condições de “cargas” que experimenta durante a vida (McNamara, 2010).

A deficiência estrogênica no período pós-menopausa na mulher é uma das condições clínicas que resulta na redução da resistência óssea (Friedman, 2006; Pinheiro et al., 2010). Neste quadro, as fraturas ósseas ocorrem em condições mínimas de esforços nos ossos, principalmente do punho, quadril, fêmur e coluna vertebral (McNamara, 2010). O aumento observado na fragilidade do osso com a idade é considerado predominantemente como resultado da diminuição acentuada da densidade mineral óssea (o que se deve a um aumento da reabsorção óssea e diminuição da fixação de cálcio nos ossos) aproximadamente de 20-30% na primeira década após a menopausa (Ahlborg et al., 2003; Antunes et al., 2003).

Diferentes medidas de resistência mecânica incluem: (i) elasticidade: capacidade de um corpo retornar à forma inicial depois que um esforço deformador deixou de agir (Durán, 2011); (ii) força máxima: carga máxima admitida pelo material e (iii) resiliência: energia absorvida antes da fratura (McNamara, 2010).

A consolidação da fratura é um processo que envolve uma série orquestrada de eventos biológicos que se seguem numa seqüência temporal e espacial específica que pode ser definida por fatores biológicos, tais como a idade e fatores mecânicos como a estabilidade da osteossíntese (Einhorn, 2005; Giannoudis et al., 2007; Gallagher e Sai, 2010).

A força de compressão máxima na coluna vertebral e a resistência à flexão de fêmures são menores em ratas ovariectomizadas (Kasugai et al., 1998, Yoshitake et al., 1999).

2.2.9. Considerações Finais

O yacon é um alimento que pode potencializar a absorção de minerais como o cálcio e conseqüentemente favorecer a manutenção da saúde óssea no período pós-menopausa, em que a reabsorção óssea torna-se mais acentuada. Os dados reportados até o momento originam-se de estudos em modelos de animais em crescimento e inexistem trabalhos realizados com seres humanos, contemplando o tema em questão. Urge a necessidade de um maior número de pesquisas pré-clínicas que esclareçam os mecanismos no trato digestório advindos do consumo do yacon tanto *in natura* quanto na forma processada. Especificamente o seu efeito no metabolismo ósseo, principalmente em modelo animal ovariectomizado, o qual permite avaliar aspectos relacionados a perda óssea com a cessação estrogênica, como observado na mulher na pós-menopausa. Acredita-se que por meio de futuras investigações seja possível determinar os reais benefícios na modulação da saúde óssea com a inserção do yacon na alimentação diária, o que contribuirá para a disseminação do consumo do mesmo e para o desenvolvimento de produtos prebióticos tendo como base esse alimento. É importante considerar ainda que dependendo da matriz alimentar fica mais fácil ou mais difícil veicular as concentrações funcionais para as avaliações tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos. Neste sentido reforça-se a importância do produto a base de yacon (PBY), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, que facilita o consumo humano e animal e favorece a execução de estudos para definir mecanismos como o consumo de doses funcionais.

2.2.9. Referências Bibliográficas

Lima-Costa M, Veras R. Saúde pública e envelhecimento. Cad Saúde Pública. 2003;19(3):700-1.

World Health Organization. Ageing and Life Course - Washington (DC): The Department of Ageing and Life Course (ALC); 2010. Available: <<http://www.who.int/fch/depts/alc/en/index.html>>. [Accessed 2010 nov 21].

Legette LL, Lee W, Martin BR, Story JA, Campbell JK, Weaver CM. Probiotics enhance magnesium absorption and inulin-based fibers exert chronic effects on

calcium utilization in a postmenopausal rodent model. *J Food Sci.* 2012; 77(4):H88-94.

Brasil. Osteoporose: cuidados para a sua saúde. Disponível em: <http://www.osteoprotecao.com.br/os_osteobr.php>. Acesso em: 07/01/2013.

Genaro PS, Martini LA. Nutrição e Saúde Óssea. *Nestlé bio: Nutrição e Saúde* 2008; 3(6): 23-29.

Lobo AR, Cocato ML, Jorgetti V, Sá LRM, Nakano EY, Colli C. Changes in bone mass, biomechanical properties and microarchitecture of calcium- and iron-deficient rats fed diets supplemented with inulin-type fructans. *Nutrition Research* 2009; 29:873-881.

Won HY, Lee JA, Park ZS, Song JS, Kim HY, Jang SM, et al. Prominent Bone Loss Mediated by RANKL and IL-17 Produced by CD4+ T Cells in TallyHo/JngJ Mice. *PLoS One* 2011; 6(3):e18168.

Guerra MTPM, Prado GLM. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa: perfil epidemiológico e fatores de risco. *Rev Bras Clin Med.* São Paulo, 2010; 8(5):386-91.

Kim YY, Jang KH, Lee EY, Cho Y, Kang SA, Ha WK, Choue R. The effect of chicory fructan fiber on calcium absorption and bone metabolism in korean postmenopausal women. *Nutr Sci* 2004; 7:151-7.

Tahiri M, Tressol JC, Arnaud J, Bornet FR, Bouteloup-Demange C, Feillet-Coudray C, et al. Effect of short-chain fructooligosaccharides on intestinal calcium absorption and calcium status in postmenopausal women: a stable-isotope study. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:449–57.

Lobo AR, Colli C, Alvares EP, Filisetti TMCC. 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* 2007; 97:776–785.

Pereira APP. Efeito da suplementação de cálcio e vitamina D no metabolismo mineral ósseo de mulheres na pós-menopausa com osteoporose. Dissertação [Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo. 2008.

Sant'Anna MSL, Ybarra LM, Paula HAA, Costa NMB, Ferreira CLLF. Probióticos e Prebióticos na absorção de minerais. In: Ferreira, CLL (editora). *Prebióticos e Probióticos – atualização e prospecção*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

Legette LL, Lee W, Martin BR, Story JA, Campbell JK, Weaver CM. Prebiotics enhance magnesium absorption and inulin-based fibers exert chronic effects on calcium utilization in a postmenopausal rodent model. *J Food Sci.* 2012; 77(4):H88-94.

Costa-Paiva L, Horovitz A P, Santos A O, Fonsechi-Carvasan G A, Pinto-Neto A M. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2003; 25(7) 507-12.

Zanette E, Stringari FF, Machado F, Marroni BJ, Ng DPK, Canani LH. Avaliação do diagnóstico densitométrico de osteoporose/osteopenia conforme o sítio ósseo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47(1): 30-6.

Pinheiro MM, Neto ETR, Machado FS, Omura F, Yang JH K, Szejnfeldl J, Szejnfeld VL. Fatores de risco para fratura por osteoporose e baixa densidade óssea em mulheres na pré e pós-menopausa. *Rev Saúde Pública* 2010; 44(3):479-85.

Ponce L, Larenas G, Riedemann P. Alta prevalencia de osteoporosis en mujeres mapuches postmenopáusicas asintomáticas. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 1365-72.

Haddock L. Prevalence of osteopenia and osteoporosis in a normal female Puerto Rican population. *P R Health Sci J* 1997; 16(3): 241-4.

Fitt N S, Mitchell S L , Cranney A, Gulenchyn K, Huang M, Tugwell P. Influence of bone densitometry results on the treatment of osteoporosis. *Can Med Assoc J* 2001; 20:164 (6): 777–81.

Looker A C, Orwoll E S, Johnston Jr. C C, Lindsay R L, Walner H W, Dunn W L, Calvo MS, Harris T B, Heyse S P. Prevalence of low femoral bone density in older US adults from NHANES III. *J Bone Miner Res* 1997, 12 (11): 1761-1768.

Asociacion Mexicana de Metabolismo oseo y Mineral. Consenso Mexicano de Osteoporosis. Juriquilla, México: oct 2000. Disponível em: URL: <http://www.osteoporosis-center.com/ostcenter.com/c014.htm>. Acesso em: 02 março 2013.

Cons-Molina F, Hinojosa MD, Rodríguez MPP. Análisis de Eficiencia de las Estrategias para Identificar Mujeres Postmenopáusicas con Osteoporosis en México. Disponível em: URL: <http://www.osteoporosis-center.com/ostcenter.com/c006-6.htm>. Acesso em: 02 março de 2013.

Tenenhouse A, Joseph L, Kreiger N, Poliquin S, Murray TM, Blondeau L, Berger C, Hanley DA, Prior JC; CaMos Research Group. Canadian Multicentre Osteoporosis Study. Estimation of the prevalence of low bone density in Canadian women and men using a population-specific DXA reference standard: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Osteoporos Int* 2000; 11(10): 897-904.

Holt G, Khaw KT, Reid DM, Compston JE, Bhalla A, Woolf AD, Crabtree NJ, Dalzell N, Wardley-Smith B, Lunt M, Reeve J. Prevalence of osteoporotic bone mineral density

at the hip in Britain differs substantially from the US over 50 years of age: implications for clinical densitometry. *British Journal of Radiology* 2002; 75: 736-42.

Curiel M D, Garcia J J, Carrasco J L, Honorato J, Pérez Cano R, Rapado A, Álvarez Sanz C. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *Med Clin* 2001; 116: 86-88.

Yang TS, Chen YR, Chen YJ, Chang CY, Ng HT. Osteoporosis: prevalence in Taiwanese women. *Osteoporosis International* 2004; 15(4): 345-7.

Baheirael A., Pocock NA, Eisman JA, Nguyen ND, Nguyen TV. Bone mineral density, body mass index and cigarette smoking among Iranian women: implications for prevention *BMC Musculoskeletal Disorders* 2005, 6:34.

Frazão P, Naveira M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica *Rev Bras Epidemiol* 2006; 9(2): 206-14.

Niness KR. Inulin and Oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 1999; 129 (7): 1402S1406S.

Kelly G. Inulin-Type Prebiotics: A Review (Part 2). *Alternative Medicine Review* 2009; 14 (1): 36-55.

Yıldız S. The Metabolism of Fructooligosaccharides and Fructooligosaccharide-Related Compounds in Plants. *Food Reviews International*. 2011; 27: 16-50.

Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L. Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 5278-5284.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995; 125: 1401-1412.

Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L., Roberfroid M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001; 41: 353-362.

Geyer M, Manrique I, Degen L, Beglinger C. Effect of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Colonic Transit Time in Healthy Volunteers. *Digestion*. 2008; 78: 30-33.

Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today* 2003; 8(15):692-700.

Sanz Y, Collado MC, Haros M, et al. Funciones metabólicas y nutricionales de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediatr Esp.* 2004; 62:520-526.

- Hidaka H, Eida T, Takizawa T, et al. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifid. Microflora* 1986; 5:37-50.
- Gibson GR, Beatty ER, Wang X, et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 1995; 108: 975-982.
- Coxam V. Inulin-type fructans and bone health: state of the art and perspectives in the management of osteoporosis. *Br J Nutr* 2005; 93: Suppl 1:S111-23.
- Roberfroid, M.B. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*. 2005; 93: S13–S25.
- Scholz-Ahrens KE, Açil Y, Schrezenmeir J. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *British Journal of Nutrition* 2002; 88:365–377.
- Rodrigues FC, Castro ASB, Rodrigues VC, Fernandes SA, Fontes EAF, Oliveira TT, Martino HSD, Ferreira CLLF. Yacon Flour and *Bifidobacterium longum* Modulate Bone Health in Rats. *J Med Food* 2012; 15(7): 664–670.
- Lobo AR, Colli C, Filisetti TMCC. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research* 2006; 26:413-420.
- Cashman KD. Diet, nutrition and bone health. *Journal of Nutrition*. 2007; 137: 2507S-2512S.
- Saulnier DMA, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009; 20: 135–141.
- Weaver CM, Martin BR, Story JA, Hutchinson I, Sanders L. Novel Fibers Increase Bone Calcium Content and Strength beyond Efficiency of Large Intestine Fermentation. *J. Agric. Food Chem*. 2010; 58: 8952–8957.
- Nagendra R, Viswanatha S, Murthy KN, Rao SV. Effect incorporation of lactulose in infant formula on absorption and retention of nitrogen, calcium, phosphorus and iron in rats. *International Dairy Journal* 1994; 4(8): 779-788.
- Ohta A, Ohtuki M, Baba S, Takizawa T, Adachi T, Mura S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1995; 41: 281-291.
- Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Hirayama M, Adachi T. Comparison of the nutritional effects of fructooligosaccharides of different sugar chain length in rats. *Nutrition Research* 1998a; 18(1): 109-120.
- Ohta A, Ohtsuki M, Uehara M, Hosono A, Hirayama M, Adachi T, Hara H. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *Journal of Nutrition* 1998b; 128(3): 485-490.

Ohta A, Sakai K, Takasaki M, Uehara M, Tokunaga T, Adachi T. Dietary heme iron does not prevent postgastrectomy anemia but fructooligosaccharides improve bioavailability of heme iron in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 1999; 69(5): 348-355.

Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C, Rémésy C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effect of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *The Journal Nutritional Biochemistry* 2000; 11: 500-508.

Sakai K, Ohta A, Shiga K, Takasaki M, Tokunaga T, Hara H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *Journal of Nutrition* 2000; 130(6): 1608-1612.

Takahara S, Morohashi T, Sano T, Ohta A, Yamada S, Sasa R. Fructooligosaccharides consumption enhance femoral bone volume and mineral concentrations in rats. *Journal of Nutrition* 2000; 130(7): 1792-1795.

Kruger MC, Brown KE, Collett G, Layton L, Schollum LM. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003; 228:683–8.

Coudray C, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier Y. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr*. 2003; 42:91–8.

Genta S, Cabrera W, Habiba N, Ponsb J, Carillo IM, Graud A, Sánchez S. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition*. 2009; 28: 182-187.

Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology*. 2011; 22: 40-46.

Peacock M. Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: S23–S30.

Costa, NMBC. Minerais. In: Costa NMBC, Pelúzio MCG. *Nutrição Básica e Metabolismo*. Viçosa: Editora UFV, 2008, 1ª ed. 263-359.

Guéguen L, Pointillart A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 2000; 19 (2): 119S-36S.

Russo LAT. Osteoporose Pós-Menopausa: Opções Terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2001; 45(4): 401-406.

Ohta A, Motohashi K, Ohtsuki M, Hirayama M, Adachi T, Sakuma K. Dietary fructooligosaccharides change the intestinal mucosal concentration of calbindin-D9K in rats. *J Nutr* 1998c; 128:934–9.

Franco G. *Tabela de composição de alimentos*. 9ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

Slovik DM, Adams JS, Neer RM, Holick MF, Potts JT. Deficient production of 1,25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic patients. *N Engl J Med* 1981; 305:372–4.

Tsai KS, Heath HD, Kumar R, Riggs BL. Impaired vitamin D metabolism with aging in women. Possible role in pathogenesis of senile osteoporosis. *J Clin Invest* 1984; 73:1668–72.

Feskanich D, Willett WC, Colditz, GA. Calcium, vitamin D, milk consumption, and hip fractures: a prospective study among postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003; 77(2): 504-511.

Roberfroid, M.B. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*. 2005; 93: S13–S25.

Lobo AR, Cocato ML, Borelli P, Gaievski EHS, Crisma AR, Nakajima K, Nakano EY, Colli C. Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour. *Food Chemistry* 2011; 126(3):885-891.

Ohta A, Uehara M, Sakai K, et al. A Combination of Dietary Fructooligosaccharides and Isoflavone Conjugates Increases Femoral Bone Mineral Density and Equol Production in Ovariectomized Mice. *JN* 2002; 132:2048–2054.

Zafar TA, Weaver CM, Zhao Y, Martin BR, Wastney ME. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J. Nutr.* 2004; 123: 399–402.

Bennell K, Khan K, McKay H. The role of physiotherapy in the prevention and treatment of osteoporosis. *Manual Therapy* 2000; 5:198 – 213.

Mello LCP, Gomide LB. Physical, chemical and biomechanical bone response of female ovariectomized rats to various intakes of supplemental fluorine. *Rev. Nutr* 2005; 18(5):593-600.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991; 15(3):175-91.

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995; 17(4 Suppl):125S-133S.

Priemel M, Schilling AF, Haberland M, Pogoda P, Rueger JM, Amling M. Osteopenic mice: Animal models of the aging skeleton. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2(3):212-218.

Gala J, Díaz-Curiel M, De La Piedra C, Calero J. Short and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. *Br J Nutr* 2001; 86(4): 521-7.

Inada M, Matsumoto C, Miyaura C. Animal models for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals. *Clin Calcium* 2011; 21(2):164-70.

- Roodman GD. Vitamin E: good for the heart, bad for the bones? *Nature Medicine* 2012; 18(4): 491-492.
- Carvalho DCL, Carvalho MM, Cliquet JR A. Osteoporose por Desuso: Aplicação na Reabilitação do Lesado Medular. *Acta Ortop Bras* 2001; 9(3): 34-43.
- Durán JHR. *Biofísica - Fundamentos e Aplicações - 2ª Ed.* São Paulo: Pearson Education, 2011. 408p.
- Szejnfeld VL. *Osteoporose: diagnóstico e tratamento.* São Paulo: Sarvier, 2000. 406p.
- Vieira JGH. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1999; 43(6): 415-422.
- Zerbini C, Souza ACA. *Histofisiologia Óssea.* Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica. Curso Oficial de Habilitação em Densitometria, versão 2.2; 2001.
- Junqueira LCCJ. Tecido ósseo. In: Koogan G (editor). *Histologia Básica.* 11ª edição, p.108-26.
- Zerbini C, Souza ACA. *Histofisiologia Óssea.* Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica. Curso Oficial de Habilitação em Densitometria, versão 2.2; 2001.
- Vicente-Rodriguez G, Ezquerro J, Mesana MI, Fernandez-Alvira JM, Rey-Lopez J, Casajus JA et al. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. *J Bone Miner Metab* 2002; 34(1):17-23.
- Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; 143(1):31-48.
- Fernandes BB. Influência de diferentes tipos de exercício sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras. *Dissertação [Mestrado].* Universidade Federal de Viçosa; 2010. 57p.
- Turek SL. *Ortopedia: princípios e sua aplicação.* 4.ed. São Paulo: Manole; 1991.
- Cheong JMK, Gunaratna NS, McCabe GP, Jackson GS, Kwempa-Steczko A, Weaver CM. Bone-seeking labels as markers for bone turnover: validation of urinary excretion in rats. *Osteoporos Int* 2011; 22:153-157.
- Carvalho AAF, Nakamune ACS, Biffe, BG, Louzada MJQ. High-sucrose effect on bone structure, hardness and biomechanics in an obesity model using Wistar male rats. *J. Morphol. Sci.* 2012; 29(1): 32-37.
- Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Micro-computed tomography assessment of fracture healing:

relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 2009; 44(2): 335-44.

Milanetti MR, Alves JM, Silva AH, Introini SO. Avaliação do reparo ósseo por microtomografia por raio-X. *Rev Med* 2011; 90(2):89-93.

Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta* 2001; 313: 95-105.

Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores Bioquímicos da Turnover Óssea na Prática Clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(1):72-78.

Carey JJ, Licata AA, Delaney MF. Biochemical markers of bone turnover. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 2006; 4(3): 197-211.

International Life Sciences Institute (ILSI). Calcium in nutrition. ILSI Europe concise monograph series. Belgium: 1999. 40p.

Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int* 2009; 20:843–851.

Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 2002; 282:1-17.

Gracitelli MEC, Vidoris AAC, Luba R, Lazaretti-Castro M. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o Fio da Meada. *Bases Fisiológicas para Utilização do PTH no Tratamento da Osteoporose. Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(3): 215-220.

Vasikaran SD, Glendenning P, Morris HA. The Role of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis Management in Clinical Practice. *Clin Biochem Rev* 2006; 27:119-121.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrin Rev* 1993; 14:424-42.

Eastell R, Robins SP, Colwell T, Assiri AMA, Riggs BL, Russell RGG. Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporosis Int* 1993; 3: 255:260.

Lind PM, Lind L, Larsson S, Orberg J. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 2001; 29(3): 265:270.

Garland DE, Stewart CA, Adkins RH, Hu SS, Rosen C, Liotta FJ, Weinstein DA. Osteoporosis after spinal cord injury. *Journal of Orthopaedic Research* 1992; 10: 371-378.

Carvalho DCL, Carvalho MM, Cliquet JR A. Osteoporose por Desuso: Aplicação na Reabilitação do Lesado Medular. *Acta Ortop Bras* 2001; 9(3): 34-43.

Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified Tissue International* 1995; 57: 344-358.

Doblaré M, Garci JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing a review. *Engineering Fracture Mechanics* 2004; 71:1809-1840.

McNamara LM. Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. *J. R. Soc. Interface* 2010; 7: 353–372.

Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK. Bone Loss and Bone Size after Menopause. *N Engl J Med* 2003; 349-4.

Friedman AW. Important Determinants of Bone Strength beyond Bone Mineral Density. *Journal of Clinical Rheumatology* 2006; 12(2):70-7.

Antunes AEC, Marasca ETG, Moreno I, Dourado FM, Rodrigues LG, Lerayer ALS. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2007; 27: 83-90.

Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005; 19(10 Suppl):S4-S6.

Giannoudis P, Tzioupis C, Almalki T, Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different? A basic science perspective. *Injury* 2007; 38(1): S90-S99.

Gallagher JC, Sai AJ. Molecular biology of bone remodeling: Implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas* 2010; 65:301–307.

Kasugai Y, Ikegami A, Matsuo K, Ohashi M, Sukamoto T, Hosoi T, Ouchi Y, Orimo H. Effects of tibolone (Org OD14) treatment for 3 months on ovariectomy-induced osteopenia in 8-month-old rats on a low-calcium diet: preventive testing for 3 months. *Bone* 1998; 22: 119–124.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1. Hipóteses

1ª- O produto à base de yacon (PBY) possui propriedade prebiótica;

2ª- O PBY pode modular favoravelmente o metabolismo ósseo no período pós-menopausa.

As hipóteses foram comprovadas mediante os seguintes experimentos:

1º- Determinação da atividade prebiótica do PBY e de doses para sua comprovação;

2º- Determinação do efeito benéfico do PBY no metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas e intactas.

3.2. Objetivo geral

Avaliar o efeito prebiótico do PBY na modulação de indicadores da saúde óssea de ratas em crescimento, ovariectomizadas e não ovariectomizadas.

3.3. Objetivos específicos

Determinar o efeito do consumo de PBY, em ratas *Wistar*, na modulação:

- De variáveis cecais (peso do ceco, pH, ácidos orgânicos);
- Da absorção intestinal de cálcio.
- Da retenção de minerais nos ossos;
- De marcadores bioquímicos séricos do metabolismo ósseo;
- Da Densitometria Mineral Óssea;
- Das propriedades biomecânicas no fêmur (força máxima, rigidez, tenacidade, módulo de elasticidade);

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios: de Processamento de Vegetais e de Culturas Láticas do Departamento Tecnologia de Alimentos (DTA)/UFV, de Nutrição Experimental e de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS)/UFV, de Imunovirologia Molecular e Glicobiologia (BIO)/UFV, de Biofármacos (BQI)/UFV, de Veterinária (VET)/UFV de Biotecnologia Molecular (BQI)/UFV e nas Faculdades de Medicina Veterinária (Laboratório de Biofísica) e de Odontologia (Laboratório de Materiais Dentários) da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, SP.

4.1. Produto à base de Yacon (PBY)

O produto à base de yacon testado foi desenvolvido no Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA/UFV, no entanto a descrição do seu desenvolvimento deve ser resguardada devido as exigências da solicitação de patente (INPI: 014110002964).



Figura 1. Produto à base de Yacon - PBY

4.2. Determinação da composição centesimal e teor de frutanos tipo inulina do produto à base de yacon (PBY)

As análises de composição centesimal do PBY foram realizadas de acordo com protocolos oficiais: umidade, determinada em estufa a 105°C até peso constante; proteínas, pelo método de Kjeldahl, sendo o teor protéico calculado pela multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25; lipídios, pelo método de extração com éter etílico em equipamento Soxhlet; e cinzas, por processo gravimétrico, por meio da carbonização das amostras, seguida de incineração em mufla a 550 °C até peso constante. O teor de fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI) foram determinados de acordo com o método enzimático-gravimétrico da utilizando o kit enzimático da marca Sigma (AOAC, 1997).

As análises dos teores de carboidratos não digeríveis, inulina e FOS do produto desenvolvido foram realizadas no CERAT – Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu-SP.

As concentrações de FOS e inulina foram mensuradas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme metodologia de Kaneko et al. (1990), com uma coluna BIO-RAD HPX 87P (fase estacionária de chumbo), utilizando água purificada como fase móvel. As amostras foram diluídas (1 g em 100 mL de água destilada), centrifugadas a 11.269 x g, e, em seguida, filtradas através de uma membrana de decafluoreto (PVDF) da polivinil Millipore com 0,22 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.

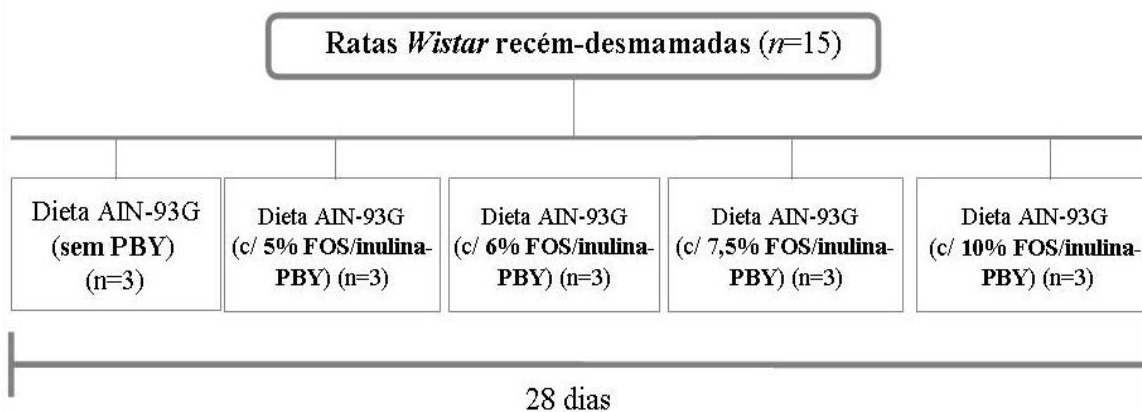
As amostras foram então injetadas em cromatógrafo de alta eficiência (HPLC) (Varian, ProStar 410 HPLC Auto Sampler; Varian Inc, USA) com detector de índice de refração e injetor automático, com as seguintes condições de operação: taxa de fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de coluna 85 °C.

Para a determinação de cálcio foi adotada a metodologia descrita por Julshamn et al. (1998) e a leitura foi feita em espectrofotômetro de absorção atômica (Varian –Agilente, SpectrAA 220FS; Austrália), no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa/UFV.

4.3. Pré-Experimento

A metodologia inclui uma pré-experimentação para definição de doses que não resultassem em efeitos adversos nos animais experimentais. O delineamento do estudo encontra-se na Figura 2.

Figura 2. Esquema representativo do modelo experimental. PBV: produto à base de



yacon. Dieta AIN-93G: dieta padronizada para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993).

4.4. Experimento

Nos grupos que receberam a intervenção com dieta teste foram utilizados a dose de 6,0% de FOS/inulina do produto à base de yacon (PBV), dose esta que foi escolhida após direcionamento obtido por meio do experimento previamente realizado, conforme supracitado.

4.4.1. Animais experimentais

Foram utilizadas 80 ratas (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da raça *Wistar*, recém-desmamadas (30 dias de idade) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.



Figura 3. Imagem dos animais experimentais nas gaiolas.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz controladas, em fotoperíodo de 12 horas e receberam água deionizada *ad libitum*.

4.5. Delineamento Experimental

O estudo consistiu de três fases distintas (Figura 4).

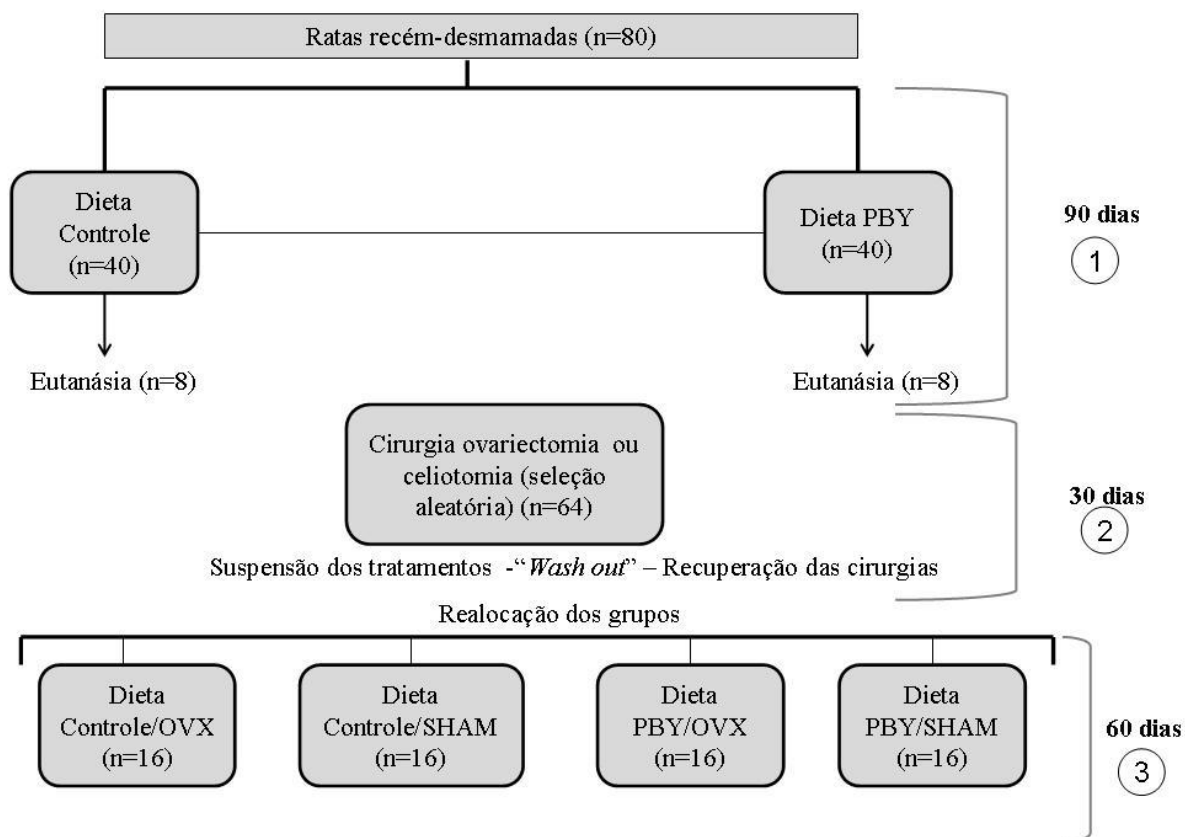


Figura 4. Esquema representativo do modelo experimental. PBY: produto à base de yacon; 1: Fase 1; 2: Fase 2; 3: Fase 3. OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico (celiotomia); Dieta controle (Dieta C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (Dieta PBY).

Na primeira fase do estudo (90 dias), em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), foi administrado aos animais dieta de crescimento AIN-93G com e sem PBY; na segunda fase, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para retirada de ovário (ovariectomia - OVX) ou submetidos à simulação de retirada do órgão (celiotomia - SHAM), e na sequência houve suspensão dos tratamentos “*Wash out*” de quatro semanas para recuperação. Na terceira fase do estudo (60 dias) administrou-se a dieta AIN-93M com e sem PBY.

Os animais foram alocados em 4 grupos (n=16), por DIC em arranjo fatorial 2² para os dois fatores cirurgia e dieta, em dois níveis: cirurgia (com e sem ovário), Dieta (com e sem produto a base de yacon).

4.6. Dietas Experimentais

Nas duas etapas do ensaio biológico o grupo controle recebeu dieta padrão para crescimento (1ª etapa, Quadro 1) ou para manutenção (2ª etapa, Quadro 2) (Reeves et al., 1993) e os grupos teste receberam as dietas acrescidas de dose de prebiótico PBY (contendo 6% FOS/inulina), variando-se a oferta de dieta entre 15 a 20 g diários.

Após o preparo das rações foram separadas alíquotas para análise da composição de cálcio e o restante foi acondicionado hermeticamente em sacos de polietileno, identificado e armazenado em refrigerador (10-15°C) até o momento da sua utilização.

Quadro 1. Composição das dietas administradas na Fase 1

Ingredientes	Dieta Controle	Dieta PBY
	(C)	(PBY)
	%	%
Caseína	20,00	20,00
Amido Dextrinizado	13,20	-
Sacarose	10,00	-
Óleo de Soja	7,00	7,00
Fibra (Celulose microfina)	5,00	3,02
Mistura de Minerais (AIN 93G)	3,50	3,50
Mistura de Vitaminas	1,00	1,00
L-Cistina	0,3	0,30
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
Amido de Milho	39,75	-
Produto à base de yacon	-	64,93
Total	100,00	100,00

Fonte: adaptado de Reeves et al., 1993. O produto à base de yacon utilizado apresentou: FOS/inulina: 9,24%; sacarose: 10,08%; frutose: 12,60%; glicose: 9,40%; proteína: 0,32%; umidade: 60,66%; cinzas: 0,51%; lipídios: 0%; Cálcio: 0,0045%. A quantidade de PBY adicionada às dietas e os teores de açúcares livres presentes no mesmo foram descontados da sacarose, maltodextrina e amido de milho, na proporção preconizada pela AIN-93G.

Quadro 2. Composição das dietas administradas na Fase 2

Ingredientes	Dieta Controle (C)	Dieta PBY (PBY)
	%	%
Caseína	14,00	14,00
Amido Dextrinizado	15,50	-
Sacarose	10,00	-
Óleo de Soja	4,00	4,00
Fibra (Celulose microfina)	5,00	5,00
Mistura de Minerais (AIN 93M)	3,50	3,50
Mistura de Vitaminas	1,00	1,00
L-Cistina	0,18	0,18
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
Amido de Milho	46,57	39,68
Produto à base de yacon	-	32,39
Total	100,00	100,00

Fonte: adaptado de Reeves et al., 1993. O produto à base de yacon utilizado apresentou: FOS/inulina: 18,52%; sacarose: 13,19%; glicose: 6,09%; proteína: 1,51%; umidade: 55,11%; cinzas: 4,72%; lipídios: 0%; Cálcio: 0,0175%. A quantidade de PBY adicionada às dietas e os teores de açúcares livres presentes no mesmo foram descontados da sacarose, maltodextrina e amido de milho, na proporção preconizada pela AIN-93G.

4.7. Cirurgia de Ovariectomia ou Celiotomia

Ao atingir 120 semanas de vida (Cheng et al., 2011; Zhang et al., 2012) metade dos animais foi submetida a cirurgia de ovariectomia (OVX), com incisão abdominal para retirada dos ovários, e a outra metade à cirurgia de celiotomia (SHAM), com incisão do abdômen para induzir o estresse cirúrgico e seus efeitos, porém sem a retirada dos ovários.

A cirurgia SHAM é considerada uma cirurgia controle, uma falsa ovariectomia, para simulação do estresse cirúrgico, com abertura do abdômen e com os mesmos procedimentos anestésicos e medicamentosos da cirurgia de ovariectomia. Assim, a palavra SHAM é conhecida e reconhecida pela comunidade acadêmica/científica e não tem tradução direta e exata.

Trinta minutos prévios ao início da cirurgia os animais receberam o anti-inflamatório flunixinina meglumina (0,68 mg/kg) e o antibiótico enrofloxocina (10 mg/kg), ambos por via subcutânea. Os animais foram tranquilizados com a

associação de diazepam (2,5 mg/kg) e fentanil (0,03 mg/kg), por via intraperitoneal. A indução e manutenção da anestesia foram realizadas com a administração de isoflurano diluído em 100% de oxigênio, por via inalatória, por meio de vaporizador calibrado. A concentração do isoflurano foi ajustada de forma a manter o plano anestésico adequado. Após a indução e estabilização anestésicas, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre colchão com aquecimento ativo e o campo operatório foi preparado com iodopovidona¹ a 10%.

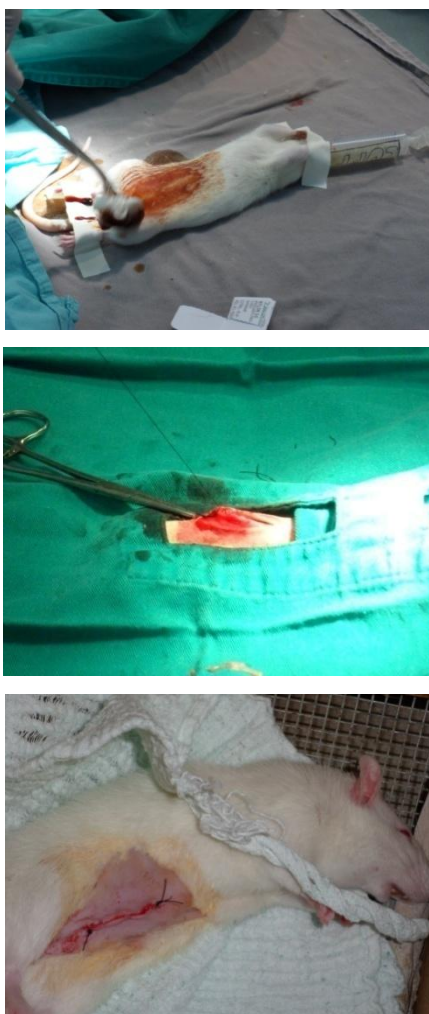


Figura 5. Fotos ilustrativas do procedimento cirúrgico a que foi submetido as ratas.

Foi utilizado o analgésico morfina na dose de 5 mg/kg por via subcutânea. Nas primeiras 5 horas após as cirurgias, os animais permaneceram em câmara aquecida, a fim de manter a temperatura corporal.

¹ Benadine Schering – Plough Veterinária. São Paulo, Brasil



Figura 6. Foto ilustrativa da câmara aquecida onde as ratas foram imediatamente colocadas após as cirurgias.

Após este período, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais até a sua pronta recuperação (4 semanas), recebendo nesse período, dieta comercial peletizada e água *ad libitum*.

Os procedimentos anestésicos-cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da UFV sob a responsabilidade da Médica Veterinária Lukiya Silva Campos Favarato (CRMV-MG nº 8981).

4.8. Determinação do Balanço de Cálcio

Foi avaliado o balanço de cálcio ($\text{Balanço} = \text{Cálcio ingerido} - \text{Cálcio Fecal} - \text{Cálcio Urinário}$) e as percentagens de retenção ($\% \text{ Retenção} = \text{Balanço} / \text{Cálcio ingerido}$) e de absorção de Cálcio ($\% \text{ Absorção} = \text{Cálcio ingerido} - \text{Cálcio Fecal} / \text{Cálcio ingerido}$) (Costa, 2008). Ao final de cada uma das duas etapas experimentais, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para quantificar a ingestão da dieta e coletar fezes e urina, a fim de se determinar o balanço.



Figura 7. Foto ilustrativa das gaiolas metabólicas utilizadas para coleta de urina.

O balanço de cálcio foi realizado durante quatro dias (Quadro 3).

Quadro 3. Cronograma da oferta de dieta e da coleta de fezes e urina

	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
Dieta	Dieta com carmim	Dieta normal	Dieta normal	Dieta com carmim	
Fezes		Coleta de fezes marcadas	Coleta de fezes totais	Coleta de fezes totais	Coleta de fezes não marcadas
Urina			Início da coleta de urina	Final da coleta de urina	

Fonte: Franco (2009)

Nesse período foram fornecidos, em média 22 g de dieta por dia e ao final de 24 horas, as sobras foram pesadas nos comedouros. Foi calculada a média diária de dieta consumida pelos animais para ser utilizada no cálculo do balanço de cálcio. Uma dieta adicionada de carmim (200 mg/100g de dieta) foi oferecida com o objetivo de marcar as fezes com coloração de azul escuro, facilitando identificar as fezes provenientes da dieta do dia de análise. No primeiro dia do período delimitado para realização do balanço, foi colocada dieta marcada com carmim. Nos dois dias seguintes foram oferecidas as dietas sem marcação e, no quarto dia retornou-se com a dieta marcada com carmim (Lobo, 2007; Franco, 2009).

O conteúdo de cálcio ingerido foi determinado pela média da quantidade de dieta consumida pelos animais no período de avaliação (quatro dias) considerando o teor desse mineral presente na dieta (0,5%) (Franco, 2009; Junior, 2009).

As fezes foram coletadas em quatro dias. No segundo dia foram coletadas as fezes marcadas com carmim e, no quinto dia foram coletadas as fezes não marcadas. O conteúdo total de fezes foi quantificado e dividido por quatro para se obter a média diária (Franco, 2009).

As fezes foram pesadas, acondicionadas hermeticamente em sacos plásticos e armazenadas em congelador a -20°C até o momento das análises. A urina foi acondicionada em tubos eppendorfs e também armazenada em congelador a -20°C até o momento das análises (Lobo et al., 2007; Lobo et al., 2009).

O volume de urina de 24 horas foi completado para 10 mL de água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2865 x g. Após a centrifugação foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20µL/mL) para a conservação da amostra (Franco, 2009).

Alíquotas das fezes e do sobrenadante da urina centrifugada foram digeridas em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluídas em água deionizada para posterior determinação de cálcio (Silva, 1990; AOAC, 1997).

4.9. Eutanásia dos animais

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por uma overdose de dióxido de carbono (Mezadri et al., 2004) para proceder as análises subsequentes. Para avaliação física e química dos ossos, os membros inferiores foram desarticulados e passaram por remoção completa dos tecidos moles, de forma que em sequência as tíbias e os fêmures fossem pesados, identificados e acondicionados (-20°C), até o momento das análises (Lobo et al., 2009; Fernandes, 2010). Foi feita a incisão da cavidade torácica para coleta de sangue, por punção cardíaca, para proceder às análises dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.

4.10. Análise do desempenho dos animais

Os pesos dos animais e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente. O ganho de peso corporal foi determinado pela diferença entre os pesos no dia da eutanásia e o do primeiro dia de experimento. Foi calculado o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), de acordo com a fórmula (Franco, 2009):

$$\text{CEA} = \text{ganho de peso (g)} / \text{consumo alimentar (g)}$$

4.11. Análise de pH, peso do ceco e ácidos orgânicos do conteúdo cecal

As amostras de conteúdo cecal, foram coletadas em sacos plásticos estéreis de polietileno da marca Whirl-Pak (Nasco Whirl-Pak[®]; Nasco, USA) com capacidade de 100mL. Após a retirada do conteúdo cecal, foi realizada a determinação do pH em pHmetro digital, devidamente calibrado (Teshima, 2001; Guigoz et al., 2002).

O ceco foi pesado e determinado o peso relativo conforme a equação: [peso relativo do ceco = peso do ceco (g) ÷ peso corporal final (g)]. O peso relativo do órgão é uma medida mais fidedigna do que o absoluto por levar em consideração também o peso corporal.

Para determinação dos ácidos orgânicos: ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta - AGCC (ácido acético, propiônico e butírico) foi utilizado método descrito por Smiricky-Tjardes et al. (2003). As amostras do conteúdo cecal foram adicionadas de 500 µL de ácido meta-fosfórico a 25%, em tubo para microcentrifugação com posterior agitação em vortex (Velp Scientifica[®], Infrared Vortex Mixer WX; Velp Scientifica, Italy) por 30 segundos, mantidas em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Após esse período, foram centrifugadas em micro centrífuga refrigerada (Centrifuge, model 5804 R; Eppendorf do Brasil, São Paulo-SP) a 14.262 x g, por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para microcentrifugação sendo novamente centrifugado por 20 minutos, nas mesmas condições descritas anteriormente. Feito isso, o sobrenadante correspondente a cada amostra foi

separado em frascos individuais, onde adicionou-se mais 400 μL de ácido meta-fosfórico a 25% seguindo-se congelamento a -20°C .

Após esta etapa as amostras foram analisadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em cromatógrafo SHIMADZU (SPD-10AVP, (SHIMADZU do Brasil, São Paulo-SP), acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se comprimento de onda de 210 nm; coluna C18 (fase inversa) da marca BIORAD (Bio-Rad Laboratories Brazil, Rio de Janeiro), com 30 cm x 4.5 mm de diâmetro, fluxo na coluna de 0,6 mL/minuto (AGCC) e de 0,4 mL/minuto (ácido láctico), pressão na coluna de 123 Kgf/cm^2 (AGCC) e de 102 Kgf/cm^2 (ácido láctico); fase móvel: água em 1% de Ácido Orto Fosfórico e volume injetado de 20 μL .

4.12. Determinação do Conteúdo Mineral Ósseo

Após a eutanásia dos animais, a tíbia direita foi retirada com o auxílio de tesoura cirúrgica, sendo dissecada para a remoção dos tecidos moles, pesada em balança analítica digital (Shimadzu[®], modelo: AY220 com precisão de 0,0001g, Japão) e armazenada em temperatura de -20°C até o momento das análises. As amostras foram preparadas sendo a tíbia colocada em tubos de ensaio individuais, específicos para a digestão de minerais. As análises de cálcio, magnésio e fósforo foram realizadas pelo método de digestão ácida, em bloco digestor, com 10 mL dos ácidos nítrico (HNO_3) e perclórico (HClO_4) na proporção 3:1. Para a análise do conteúdo mineral dos ossos adicionou-se a solução ácida, previamente mencionada, e os tubos foram mantidos em capela de exaustão de gases por aproximadamente 6 horas até que as tíbias estivessem totalmente dissolvidas (sem identificar fragmentos ósseos) (Franco, 2008; Rodrigues, 2012).

Os tubos de ensaios foram aquecidos por 16 horas no bloco digestor a uma temperatura variando entre 80 e 160°C . A cada 20 minutos a temperatura foi elevada progressivamente em 20°C até alcançar 160°C . Após as primeiras 8 horas de digestão, foram adicionados 5 mL de solução ácida ($3\text{HNO}_3 + 1\text{HClO}_4$) para evitar que a solução secasse. Ao final da digestão, os tubos permaneceram na capela de exaustão, resfriando a temperatura ambiente. Após esta etapa, o conteúdo do tubo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água deionizada. Deste balão volumétrico retirou-se uma alíquota para a leitura dos minerais.

Posteriormente, para as análises de cálcio e magnésio, ao material digerido foi adicionado 5 mL (10%) de solução de cloreto de estrôncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Foi analisado o conteúdo de cálcio, nas dietas depois de preparadas e no produto à base de yacon. O cálcio foi ainda determinado na urina e nas fezes diluídos e na tibia inteira diluído.

Todo o material utilizado (vidraria, recipientes de plástico), para a análise dos minerais mencionados, foi submetido previamente a lavagem em água corrente e detergente neutro, imersão por 24 horas com detergente seguida de enxágue com água deionizada, imersão em solução de ácido nítrico (HNO_3) a 10% por 24 horas, seguido de enxágue com água deionizada, e secagem em estufa. Todas as etapas de enxágue foram realizadas em série de três repetições (Franco, 2009).

Os minerais (cálcio, magnésio e fósforo) foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Varian - Agilente, SpectrAA 220FS - Fast Sequencial, Austrália), do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa/UFV.

4.13. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

As análises do biomarcadores ósseos de formação (Fosfatase Alcalina) e reabsorção (Telopectídeo Aminoterminal do Colágeno tipo I) foram realizadas utilizando Kits comerciais. Todos os procedimentos foram realizados conforme preconizado no manual técnico do fabricante

Para análise da Fosfatase Alcalina foi utilizado o Kit da marca Bioclin. As amostras foram hidratadas com 200 μL de NaCl 0,9%, sendo feito a leitura em aparelho analisador multiparamétrico para análises bioquímicas (Alizé B.652; Lisabio, France) no Laboratório de Biofármacos – Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa.

Os níveis séricos de Telopectídeos Aminoterminais do colágeno tipo I (NTx) foram avaliados por meio de ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) da marca USCNK – Life Science Inc (Figura 8). A leitura da placa foi realizada em equipamento leitor de microplaca (Versa max, microplate reader) no Laboratório de Biotecologia Molecular - Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa/UFV.



Figura 8. Placa de Elisa com as amostras de soro das ratas do estudo e com os reagentes específicos.

4.14. Avaliação da Densidade Mineral Óssea

O fêmur direito foi removido, os tecidos moles foram retirados e o osso foi depositado em uma gase embebida com soro fisiológico e armazenado em freezer a -20°C . As amostras foram descongeladas imediatamente antes das análises (Fernandes, 2010).

A análise da Densidade Mineral Óssea (DMO) foi realizada em Densitômetro Ósseo de Raios-X (LUNAR DPX-ALPHA) (Figura 9^a), na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, SP.

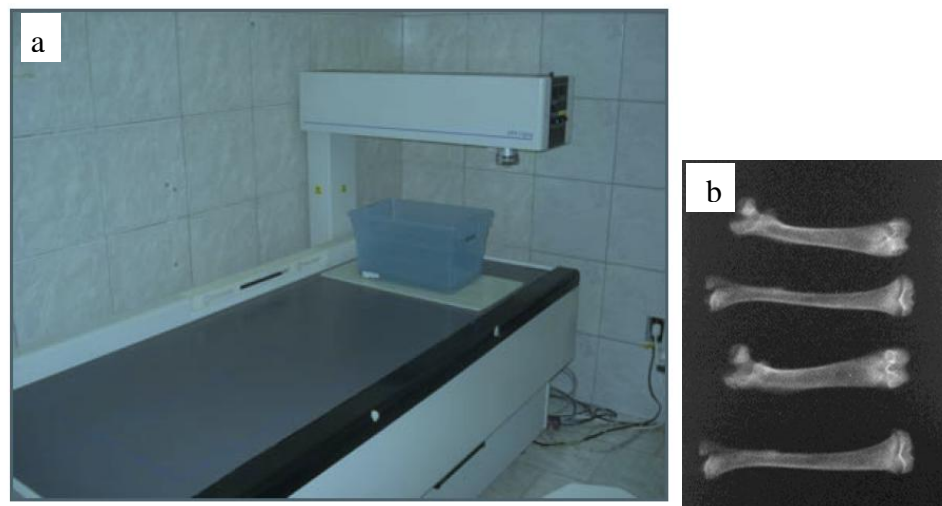


Figura 9. ^aDensitômetro Ósseo de Raios-X. ^bImagens de fêmur de ratas. Laboratório de Biofísica. Departamento de Medicina Veterinária. Unesp/Araçatuba-SP.

As imagens dos ossos (iniciais e finais) foram capturadas e analisadas com software específico para exames em pequenos animais (Figura 10).



Figura 10. Software específico para exames de DXA em pequenos animais. Laboratório de Biofísica. Departamento de Medicina Veterinária. Unesp/Araçatuba-SP.

4.15. Análise Física – Propriedades Biomecânicas

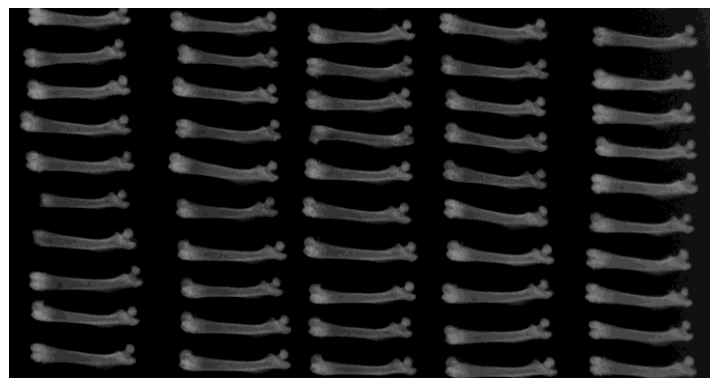


Figura 11. Amostras de fêmures de ratas que foram submetidos aos ensaios biomecânicos.

A análise da resistência óssea foi realizada no mesmo fêmur direito, logo após a análise da DMO (Fernandes, 2010). O osso foi submetido a ensaio mecânico em máquina universal de ensaio (EMIC®, modelo DL 3000), do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia da UNESP, Araçatuba-SP, com carga aplicada a uma velocidade de 5mm/min. Um sistema computadorizado acoplado ao aparelho registra a força (carga) e o deslocamento, permitindo obter o valor da força referente a cada deslocamento. A aquisição destes pontos foi realizada em intervalos padronizados de tempo definidos pelo programa. A análise foi realizada tanto no colo do fêmur (com predomínio do osso esponjoso) como também no terço médio da diáfise (com predomínio do osso cortical).

Foi realizado ensaio de flexão na cabeça do fêmur, com a amostra fixada em um aparato mecânico ficando em posição vertical. A cada incremento de carga aplicada ao material o computador automaticamente registrou a deformação correspondente, para, depois ser construído o gráfico carga *versus* deformação, a partir do qual pode-se obter: força máxima (maior força aplicada à amostra) e rigidez (dada pela inclinação da curva na fase elástica). Também foi avaliada a tenacidade das amostras, que corresponde à energia absorvida pelo corpo, obtida pelo cálculo da área sob a curva carga *versus* deformação até o ponto de ruptura da amostra.



Figura 12. ^aAparelho Universal de Ensaio EMIC[®] acoplado a um computador. ^bFêmur de ratas. Laboratório de Materiais Odontológicos e Prótese. Departamento de Odontologia. Unesp/Araçatuba-SP.

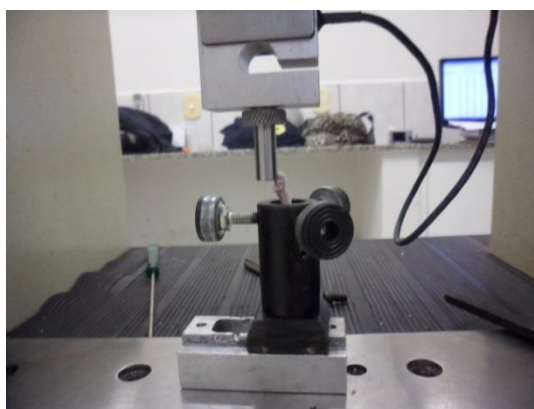


Figura 13. Aparelho Universal de Ensaio EMIC[®] acoplado a um computador. Laboratório de Materiais Odontológicos e Prótese. Departamento de Odontologia. Unesp/Araçatuba-SP.

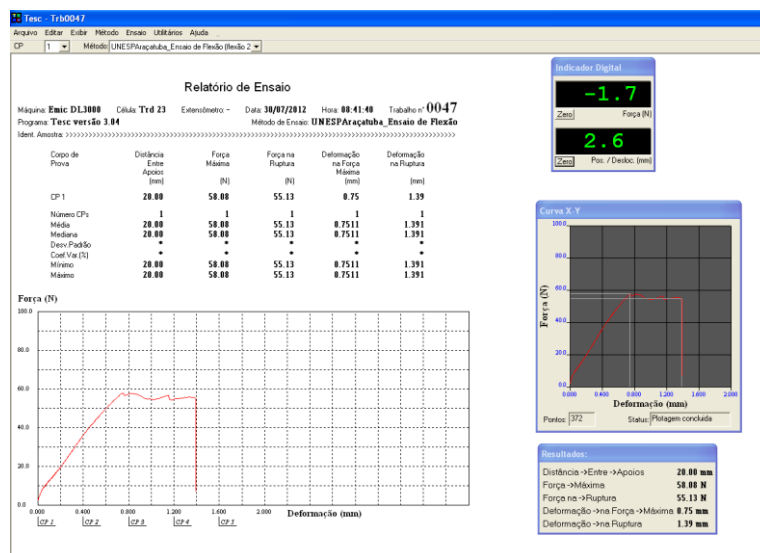


Figura 14. Captação dos dados pelo computador acoplado ao Aparelho Universal de Ensaio EMIC[®]. Laboratório de Materiais Odontológicos e Prótese. Departamento de Odontologia. Unesp/Araçatuba-SP.

Na diáfise femural, para melhor simular efeito da força de compressão exercido pelo corpo, foi utilizado um bloco obtido dessa região do fêmur, procedendo-se da seguinte maneira: foi utilizado uma estrutura metálica e borracha, ambos de aproximadamente 5 mm de largura e 20mm de comprimento. Apertou-se a estrutura com alicate de modo que ele se fechasse. Com uma pinça Halsted (mosquito) prendeu-se o osso pela estrutura. Segurou-se a pinça e usou-se o dedo como apoio e passou-se o osso por uma serra elétrica, de ambos os lados. Com a própria pinça retirou-se o osso cortical. Em seguida obteve-se a imagem do bloco obtido e realizou-se o ensaio de flexão em aparelho Universal de Ensaio EMIC[®] acoplado a um computador, conforme supracitado.



Figura 15. ^aOsso (fêmur de rata), ^bestrutura metálica e borracha (ambos de aproximadamente 5mm de largura e 20mm de comprimento).

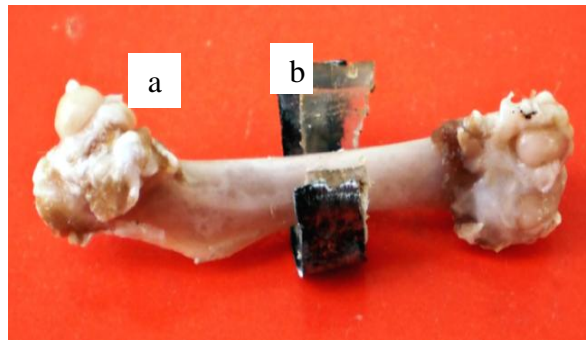


Figura 16. Etapa 1 para obtenção do bloco ósseo da região da diáfise femural. O osso^a é envolto medialmente pela estrutura metálica e borracha^b.

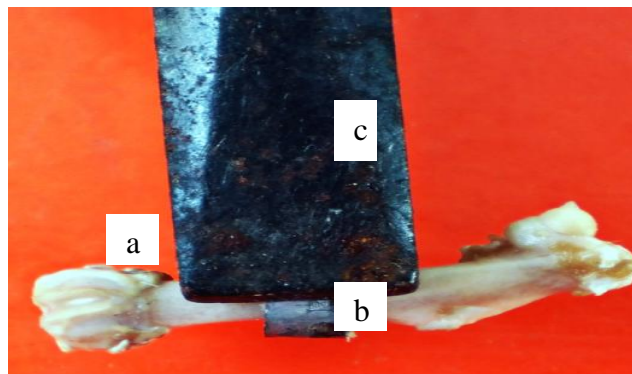


Figura 17. Etapa 2 para obtenção do bloco ósseo da região da diáfise femural. Aperta-se o fêmur^a que está envolto pela estrutura com borracha^b por meio de um alicate^c, de modo que ela se feche.

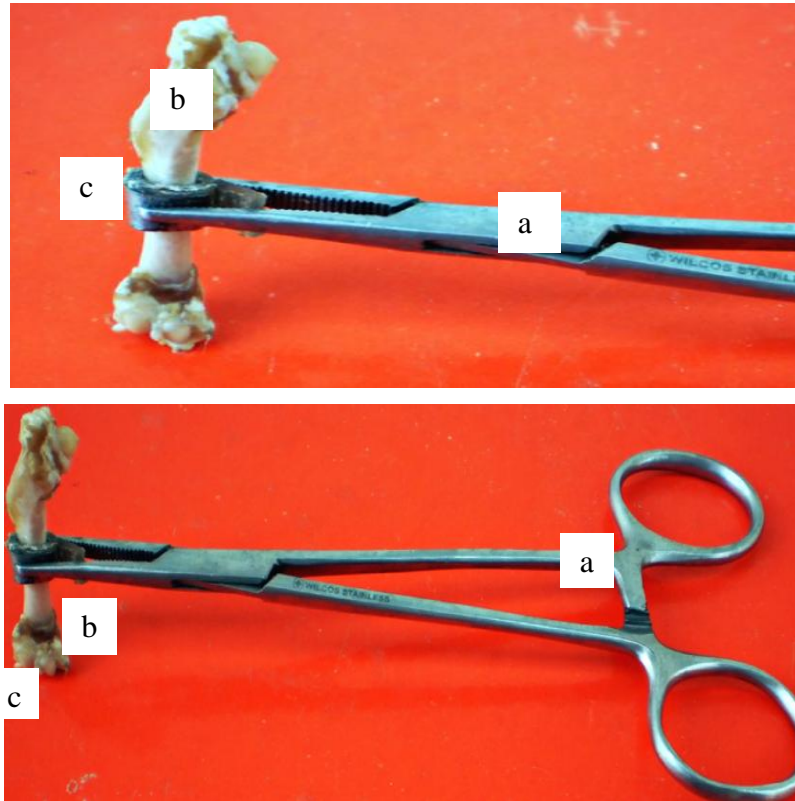


Figura 18. Etapa 3 para obtenção do bloco ósseo da região da diáfise femural. Com uma pinça Halsted (mosquito)^a prende-se o fêmur^b pela estrutura com borracha^c.

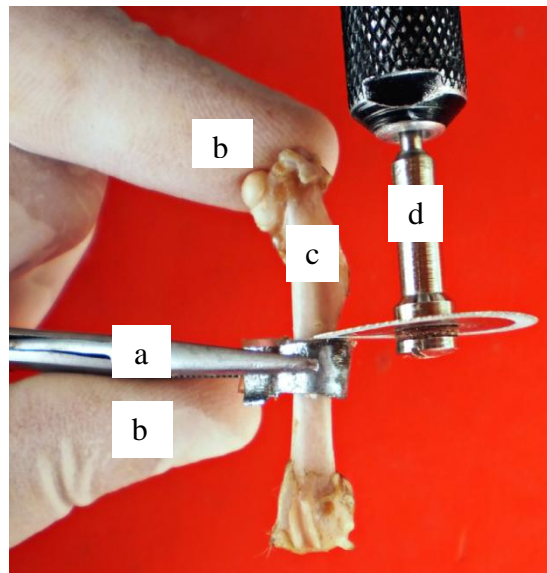


Figura 19. Etapa 4 para obtenção do bloco ósseo da região da diáfise femural. Segura-se a pinça^a e usando o dedo^b como apoio, passa-se o osso^c pela serra^d de ambos os lados.

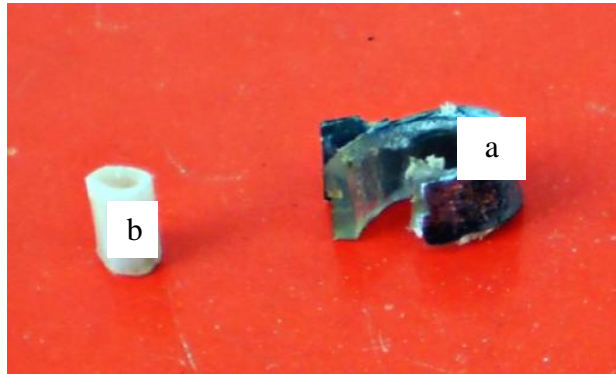
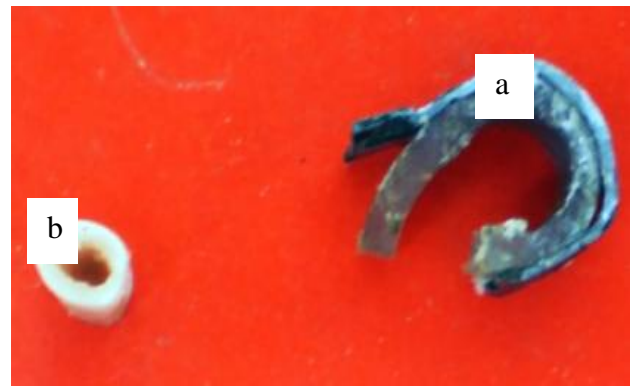
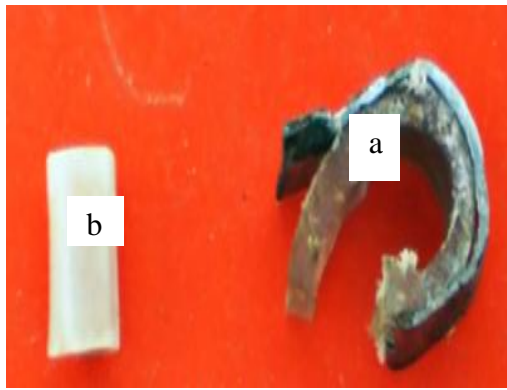


Figura 20. Etapa 5 para obtenção do bloco ósseo da região da diáfise femoral. Abre-se a estrutura^a e retira-se o bloco de osso cortical^b, como demonstrado acima.

Com as imagens dos blocos obtidos utilizou-se o programa Image J, de domínio público (<http://rbs.info.nih.gov/ij>), por meio do qual calculou-se a área para as variáveis de interesse.

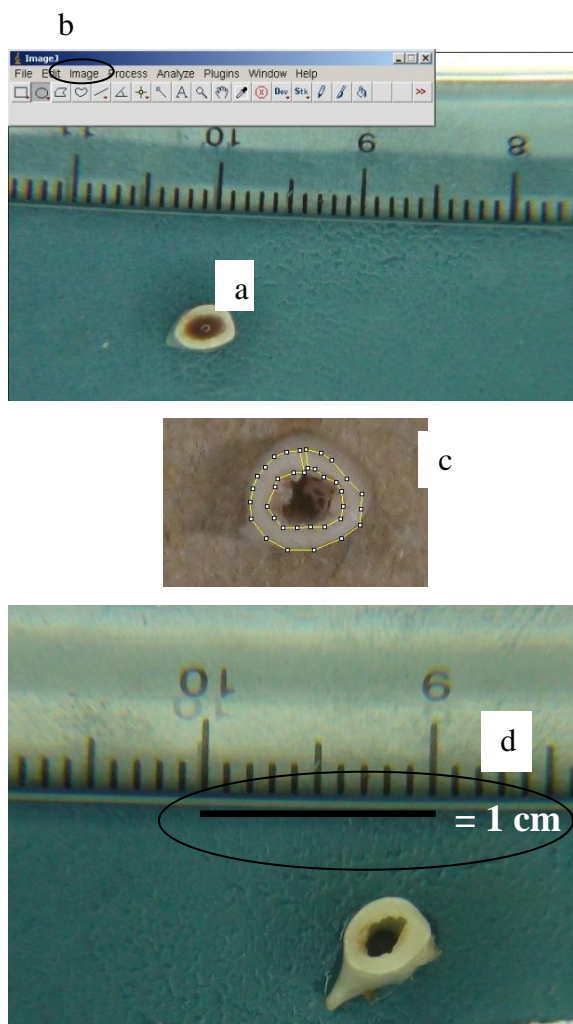


Figura 21. Imagens de bloco ósseo da região da diáfise femural^a capturadas no programa Image J^b. Antes de fazer o contorno no bloco ósseo^c, é necessário editar a escala^d do programa Image J, para calcular a área.

4.16. Análise estatística

As análises de variância (ANOVA) e regressão linear foram realizadas no software SAS® (*Statistical Analysis System* – SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1989) versão 9.1 licenciado para a Universidade Federal de Viçosa. Considerou-se um nível de significância de 5% para todas as análises.

Observação: Todas as tabelas com o resumo das análises de variância dos resultados dos artigos encontram-se no Apêndice I (item 9.1) e II (item 9.2). Os dados brutos do estudo encontram-se no Apêndice III (item 9.3).

4.17. Aspectos Éticos

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa com animais da Universidade Federal de Viçosa, parecer nº 55/2011 (Anexo 8.1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Artigo: – Pré-Experimento

“Fecal score and cecum profile of Wistar rats fed a novel yacon based product source of Fructooligosacharides/inulin”

5.2. Artigo: – Experimento – Fase 1

“Produto a base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) contribui favoravelmente ao metabolismo ósseo de ratas *Wistar*”

5.3. Artigo: – Experimento – Fases 2 e 3

“Produto à base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) modula biomarcadores do metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas?”

5.1. ARTIGO: – Pré-Experimento

Fecal score and cecum profile of Wistar rats fed a novel yacon based product source of Fructooligosaccharides/inulin

Abstract

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a functional food and its prebiotic activity has recently been emphasized, considering the high concentrations of fructooligosaccharides (FOS) and inulin. The objective of this study was to evaluate different concentrations of FOS/inulin of a yacon-based product (PBY) (0% - control group, 5%, 6%, 7.5% and 10%) on the cecal and fecal profiles in rats. Animal performance (weight gain and feed efficiency ratio) was not affected by increasing the concentration of FOS/inulin in the diets ($P>0.05$). Animals receiving 6% FOS/inulin in the diet presented the highest concentrations for the Short chain fatty acids (SCFA) acetate and butyrate ($P<0.05$) in the cecal contents. Basal and apical diameters as well as depth and numbers of cecal crypts from the various treatments did not differ from the control ($P>0.05$), indicating that the tested concentrations did not onset any aberration and/or crypts overgrowth onto the cecum epithelium. Higher feces moisture content (55.20% and 58.15%), feces weight (3.95g and 4.59g), relative cecum weight (0.0091 and 0.0092) and osmotic diarrhea (scores between 2 and 3) were observed in the groups consuming the diets containing 7.5% and 10% FOS/inulin, respectively. Therefore, the addition of the 6% of 6% FOS/inulin from PBY in the diet did not cause gastrointestinal disorders and did not induce physical undesirable changes in the cecum of Wistar rats. It is suggested that this concentration could induce functional changes in the host and might be used in *in vivo* rat models to evaluate specific functional effects of this new functional food product.

Keywords: yacon, inulin-type fructans, cecum, feces, short chain fatty acids

1. Introduction

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), is a tuberous root of Andean origin considered a functional food and recently its prebiotic activity has been emphasized due to its high contents of fructooligosaccharides (FOS) and inulin (Lobo et al., 2007; Genta et al., 2009; Ojansivu et al., 2011).

The difference between FOS and inulin resides in the number of fructose molecules that make up their molecular chains. In inulin, this number ranges from 2 to 60, while in FOS the chains are smaller and typically range from 2 to 10. Inulin and FOS are also called inulin-type fructans, a generic term used to describe oligo- or polysaccharide prebiotics in which β (2-1) fructosyl-fructose glycosidic bonds dominate (Roberfroid, 2005; Yıldız, 2011). These bonds give these compounds their unique structural and physiological properties (Niness, 1999). Neither man or animals possess enzymes capable of hydrolyzing these bonds and after consumption, inulin and FOS are selectively fermented in the colon by a group of beneficial bacteria, especially those of the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. They act to improve gastrointestinal function (Cumplings and Macfarlane, 2002; Pedreschi et al., 2003), generating organic acids such as lactic acid and other short-chain fatty acids (SCFA) found in the form of acetate, propionate and butyrate (Gibson and Roberfroid, 1995; Flamm et al., 2001; Geyer et al., 2008) which act differently.

The commercial products currently used as prebiotics to make functional foods are usually purified and isolated from roots of chicory and Jerusalem artichoke, and both are expensive. The fact that the yacon root is rich in FOS and can be consumed *in natura* has increased its popularity as a functional food with the objective of reducing the risk of various types of chronic diseases such as diabetes (Aybar et al., 2000; Genta et al., 2009), obesity (Genta et al., 2009), dyslipidemia (Genta et al., 2005; Manrinque et al., 2005) and osteoporosis (Lobo et al., 2007, Lobo et al., 2009).

However, the yacon root *in natura* has a limited shelf life due to its high water content. Processing of this root is an alternative to increase its shelf life. For this reason a yacon-based product (PBY) was developed with intermediate moisture content, increased shelf-life and high flexibility of use for supplementation of different food matrices. As a new ingredient, the PBY concentrations with functional properties must be evaluated with respect to safety of their consumption.

Therefore, in order for the consumption of FOS and inulin prebiotics to benefit the host, especially in regulation of the digestive system (Wong et al., 2006; Havenaar, 2011) and improving systemic health (Aybar et al., 2000; Manrinque et al., 2005; Genta et al., 2009), the dose should be administered so as to promote positive effects without causing gastrointestinal complications

such as abdominal distension, flatulence and/or diarrhea. The laxative effect attributed to inulin-type fructans may be small and difficult to detect except in carefully controlled studies (Cummings and Macfarlane, 2002).

Concentrations of FOS/inulin which may be administered in the diet is not a topic well discussed in scientific literature. Some studies (Bouhnik et al., 1999; Weaver et al., 2010) suggest doses that would provide the desired positive effect without gastrointestinal irregularities, but most studies (Ohta et al., 2002; Scholz-Arhens et al., 2002; Kruger et al., 2003; Zafar et al., 2004; Devareddy et al., 2006; Lobo et al., 2007) do not mention the presence of diarrhea even with concentrations of 7.5% and 10% FOS/inulin when using a purified product. In the study conducted by Weaver et al. (2010), utilization of 10% inulin and inulin/FOS (purified products) among other types of fibers was proposed, and it was reported that after two weeks of the experiment it was necessary to reduce the fiber content to 5% due to negative changes in the fecal profile. This reinforces the importance of observing the occurrence of adverse effects according to the FOS/inulin concentrations tested, permitting that the best doses be used in subsequent studies.

It is therefore necessary to identify the concentration of the prebiotic substance that will promote beneficial effects without causing gastrointestinal disorders such as osmotic diarrhea. Due to the importance of this information for planning intervention studies with prebiotics in the *in vivo* model, the objective of the present study was to evaluate different concentrations of FOS/inulin in a yacon-based product on the ceacum and feces profiles of Wistar rats.

2. Material and Methods

2.1. Animals

A bioassay was conducted with 15 female Wistar rats (*Rattus norvegicus*, *albinus* variety), with 30 days of age and an average initial weight of 82.6 g. The animals were obtained from the Central Biotery of the Biological Sciences and Health Center, Federal University of Viçosa, (Viçosa, Minas Gerais, Brazil) and maintained in individual cages with deionized water *ad libitum*, temperature-controlled environment at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ and photoperiod of 12 hours during the 28 days experimental period. Experimental procedures were

approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Viçosa, process no. 55/2011.

2.2. Experimental Design

The study was conducted in a completely by employing a completely randomized design (CRD) with a control (0%) and four concentrations of FOS/inulin in the yacon-based product (5%, 6%, 7.5% and 10%) and three replications, totaling 15 experimental units. Testing doses of FOS/inulin were chosen from scientific studies where gastro intestinal adverse effects were not observed. For analysis of the feces weight, the experiment was performed in a CRD with a split plot design, where the plots consisted of the FOS/inulin concentrations and the subplots were the times for assessment of feces weight.

Food consumption , relative weight of the cecum (RW), animal weight gain , cecal pH , feces moisture content, fecal score, and SCFA were evaluated and determined after 28 days of feeding.

2.3. Experimental Diets and PBY FOS/inulin determination

Experimental diets were prepared according to the standard diet for rodents AIN-93G, (REEVES et al. 1993) (Table 1). The amount of the PBY added was calculated considering its FOS/inulin composition in order to achieve 5.0%, 6.0%, 7.5% and 10% FOS/inulin concentration. The control group received the standard diet AIN-93G with no addition of the PBY.

Table 1. Composition of the feeding diets.

Ingredients* g/100g diet	Experimental Diets				
	Control 0% FOS/inulin	5% FOS/inuli n	6% FOS/inuli n	7.5% FOS/inuli n	10% FOS/inulin
Cornstarch	39.75	32.69	28.63	22.54	12.17
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Dextrinized cornstarch	13.2	-	-	-	-
Sucrose	10.0	4.87	3.85	2.32	-
Soybean oil	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Fiber (microfine cellulose)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-cystine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Yacon-based product - PBV	-	25.39	30.47	38.09	50.78

*Based on the composition of AIN-93G (Reeves et al., 1993), the diet indicated for experiments using growing rodents. The yacon-based product used presented the following composition: 14.95% FOS, 4.74% inulin, 9.34% sucrose, 3.01% glucose and 7.87% fructose. The amount of PBV added to the diets and the concentrations of free sugars present in the diet were subtracted from sucrose, maltodextrin and corn starch, at the ratio recommended by the AIN-93G.

The PBV evaluated in this study is a patented process (INPI: 014110002964) and contained 19,69% FOS/inulin determined with high performance liquid chromatography (HPLC) according to the methodology of Kaneko et al. (1990). In short, it was employed a BIO-RAD HPX 87P column (lead stationary phase), and purified water as the mobile phase. Samples were diluted (1 g in 100 mL of distilled water), centrifuged at 11,269 x g, and then filtered through a Millipore polyvinyl difluoride membrane (PVDF) with 0.22 µm porosity. The samples were then injected into a liquid chromatograph, (Varian, ProStar 410 HPLC Auto Sampler; Varian Inc, USA) with a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ and column temperature of 85°C.

2.4. Animal performance

Food consumption was assessed daily and the animals were weighted once a week. Dietary intake was estimated by the weight of feed supplied and that of the leftover. Weight gain was calculated [weight gain = body weight of the animal at the end of the experiment (g) – body weight of the animal at the beginning of the experiment (g)] and the Feed Conversion Ratio [FCR = weight

gain (g) ÷ feed intake (g)], corresponding to the change in body weight per gram of feed consumed (Weaver et al., 2010).

2.5. Fecal weight (FW), fecal score rate, and humidity

The FW and score were monitored daily. For the fecal score the following scale was considered: 1. Firm or normal feces consistency; 2. Viscous non-diarrheal feces; 3. Watery feces characteristic of diarrhea (adapted from Freitas et al., 2006). The representative images of fecal scores used in this study are shown in Figure 1.

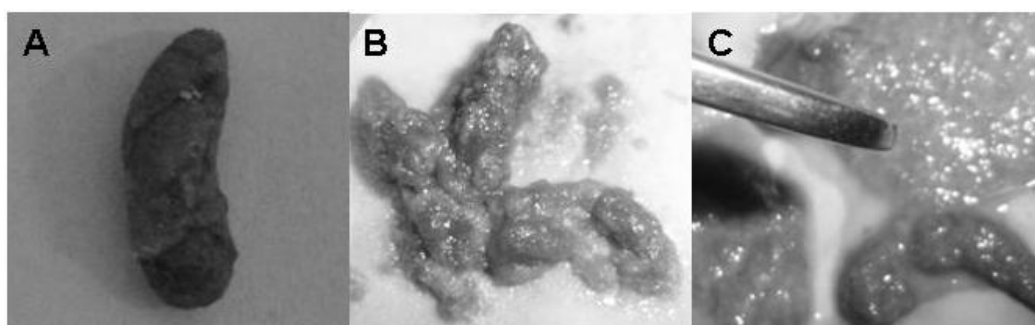


Figure 1. Representation of the fecal score in *Wistar* rats that received different concentrations of FOS/inulin in the yacon-based product (*Smallanthus sonchifolius*). **A.** Score 1 = Firm feces or normal consistency; **B.** Score 2 = Viscous non-diarrheal feces; **C.** Score 3 = Watery feces characteristic of diarrhea.

The moisture content of the feces was measured by pooling the feces from all animals of each treatment group during an eight day period and drying at 105°C according to AOAC(1997).

2.6. Cecum weight (CW), relative cecum weight (RW), pH, and SCFA concentration in the cecal content

At the end of this study the animals were euthanized in a carbon dioxide atmosphere (referencia). Cecal pH was evaluated *in situ* by inserting an electrode into the ileocecal junction according to Lobo et al. (2011). The cecum was weighed and the relative weight (RW) was calculated according to the equation: $[RW = CW (g) \div final\ body\ weight (g)]$. The cecal contents were collected in sterile polyethylene plastic bags (Nasco Whirl-Pak®; Nasco, USA). The method for SCFA (acetic, propionic and butyric acids) determination was reported by Smiricky-Tjardes et al. (2003). In short, after additions of 500 µL of

meta-phosphoric acid 25% to the cecal contents the mix were vortexed and microcentrifuged (model 5804 R; Eppendorf do Brasil, São Paulo-SP), for 30 seconds. After a 30 minute standing at room temperature ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) samples were micro centrifuged at $14.262 \times g$ for 30 minutes The supernatant was transferred to another microcentrifuge tube and centrifuged again for 20 minutes under the same previous conditions. Next, the supernatant corresponding to each sample was separated into individual vials, where an additional $400 \mu\text{L}$ of meta-phosphoric acid 25% was added followed by freezing at -20°C . After this step the samples were analyzed in a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (model SPD-10AVP; SHIMADZU Brazil, São Paulo-SP), coupled to the Ultra Violet detector (UV) using a wavelength of 210 nm; C18 column (reverse phase) (BIORAD; Bio-Rad Laboratories Brazil, Rio de Janeiro) 30 cm x 4.5 mm diameter column, flow rate of 0.8 mL/min, column pressure of 160 kg/cm^2 , mobile phase: water in 1% of orthophosphoric acid and injection volume of $20 \mu\text{L}$.

2.7. Histological Analysis

The effect of consumption of PBY in the doses studied in this work, the histology of the cecum epithelium was evaluated to verify if any adverse effect was induced by the FOS/inulin concentrations administered to the animals. . After evisceration the cecum fragments were extracted, fixed with formalin for 24h and processed according to the routine method for inclusion in paraffin. After preparation of the paraffin blocks, sections were obtained with approximately $6 \mu\text{m}$ thickness. Then followed staining with hematoxylin and eosin (HE). To count the number of crypts and to measure their depth and basal and apical diameters, 135 fields (dimensions: $1596 \times 1196 \text{ pxls}$) of histological sections were digitized using a photomicroscope (Olympus Biological Microscopes, CX31; Olympus, Tokyo) (10x objective) and the crypts numbers and measurements were made in each histological field using the Image-Pro Plus Software version 4.5 (pedir informação a prof Sirlene sobre o distribuidor desse software).

2.8. Statistical Analysis

Analyses of variance (ANOVA) and linear regression were performed using the software SAS[®] (*Statistical Analysis System* – SAS Institute Inc., North

Carolina, USA, 1989) version 9.1 licensed to the Federal University of Viçosa. A significance level of 5% was considered for all analyses.

3. Results

3.1. Animal performance

Results of body weight gain, feed efficiency ratio, relative cecum weight, feces weight, feces moisture content and feces score of rats are indicated in Table 2.

Table 2. Body weight gain (WG), feed efficiency ratio (FER), relative cecum weight (RCW), feces weight (FW), feces moisture content (FM) after 28 days, of administration of the diets containing different concentrations of FOS/inulin from a yacon-based products (PBY)

Variable	Experimental Group (%) FOS/inulin					P>F*
	Control - 0%	5%	6%	7.5%	10%	
WG(g)	112.67 ± 7.23	102.00 ± 26.28	112.33 ± 13.43	115.00 ± 23.52	109.67 ± 9.61	0.9083
FER	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.06	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.9141
RCW	0.0045 ± 0.0005	0.0065 ± 0.0013	0.0071 ± 0.0010	0.0091 ± 0.0010	0.0092 ± 0.0002	0.0017
FW (g)	1.22 ± 0.32	2.21 ± 1.00	2.77 ± 2.27	3.95 ± 1.54	4.59 ± 3.03	0.0001
FM (%)	14.76 ± 2.60	39.41 ± 17.78	41.43 ± 5.00	55.20 ± 11.01	58.15 ± 16.62	0.0102

Fecal score for diarrhea (1 = Firm feces or normal consistency; 2 = Viscous non-diarrheal feces; 3 = Watery feces characteristic of diarrhea [Adapted from Freitas et al., 2006]); Significance level: 5% by the Fischer test*.

Although the animal performance measured as WG and FER did not change with the consumption of different concentrations of FOS (P> 0.05) (Table 2), the increasing of the concentration of FOS/inulin in the diets induced higher values for the variables FM, FW and RCW (P <0,05).

3.2. Fecal score rate

The fecal scores averages are depicted in figure 2.

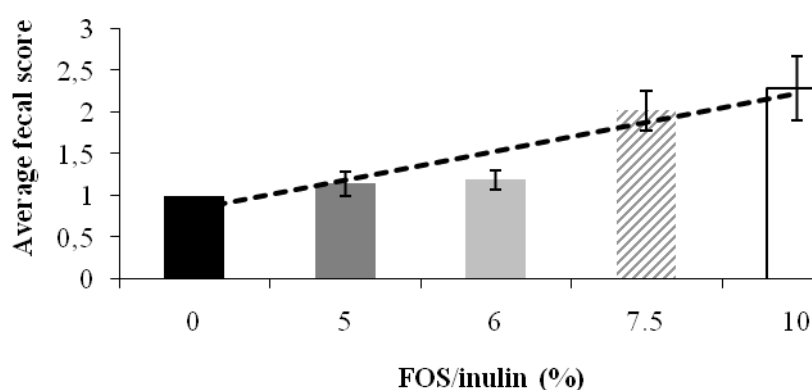


Figure 2. Average fecal score of Wistar rats which consumed diets containing different concentrations of FOS/inulin in the yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-based products after 28 days of feeding. Fecal score for diarrhea (1 = Firm feces or normal consistency; 2 = Viscous non-diarrheal feces; 3 = Watery feces characteristic of diarrhea).

According to the fecal scores, the consistency of the feces of the animals with consumption of up to 6% FOS/inulin was normal. Higher concentrations induced different degrees of physical changes varying from a FS of 2. (viscous non-diarrheal feces) to 3 (watery feces characteristic of diarrhea)

3.3. pH, and concentration of SCFA in the cecal content

The cecal pH and concentrations of propionate did not vary ($p > 0.05$). However, the diets containing 6% of FOS/inulin induced the highest production of acetate ($p = 0.0168$) and butyrate ($p = 0.0445$) (Table 3).

Table 3. Results of cecal pH and short chain fatty acids in rats ($n = 3/\text{group}$) after 28 days of feeding with different concentrations of FOS/inulin in the yacon-based product (0% - control group, 5%, 6%, 7.5% and 10%) of the experimental diets.

Variable	Experimental Group (%) FOS/inulin					P>F*
	Control - 0%	5%	6%	7.5%	10%	
Cecal pH	6.43 ± 0.08	6.48 ± 0.25	6.21 ± 0.49	6.70 ± 0.21	6.75 ± 0.38	0.2882
Acetate ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	46.14 ± 3.07	45.42 ± 7.41	46.30 ± 9.52	43.76 ± 10.71	23.99 ± 1.74	0.0168
Butyrate ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	33.43 ± 3.76	32.56 ± 18.74	68.77 ± 14.82	46.77 ± 29.00	17.52 ± 9.89	0.0445
Propionate ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	36.45 ± 1.13	40.36 ± 16.86	53.06 ± 11.13	41.22 ± 19.60	18.26 ± 4.07	0.0761

Significance level: 5% probability by the Fischer test*.

3.4. Histological Analysis

The variables of number of cecal crypts per histological field (NCF), cecum crypt depth (CCD) and basal and apical diameters of cecal crypts (BDCC and ADCC, respectively) did not differ among the treatments at 5% probability (Table 4).

Table 4. Number of cecal crypts (NCC) per histological section, cecum crypt depth (CCD), basal diameter of cecal crypts (BDCC) and apical diameter of cecal crypts (ADCC) after 28 days of feeding Wistar rats (n=3/group), with diets containing different concentrations of FOS/inulin from a yacon-based product (PBY).

Variable	Experimental Group (%) FOS/inulin					P>F*
	Control - 0%	5%	6%	7.5%	10%	
NCC	16.45 ± 4.59	14.69 ± 3.19	16.17 ± 3.56	15.25 ± 0.98	14.69 ± 2.41	0.9338
CCD (µm)	209.98 ± 41.70	229.53 ± 32.15	220.75 ± 20.43	253.57 ± 35.66	248.76 ± 51.86	0.1970
BDCC (µm)	45.79 ± 5.46	48.24 ± 8.86	49.05 ± 0.56	52.97 ± 6.18	53.32 ± 1.75	0.4361
ADCC (µm)	32.21 ± 5.35	31.05 ± 7.61	29.85 ± 4.48	30.24 ± 6.84	27.4 ± 3.91	0.8834

Significance level: 5% probability by the Fischer test*.

4. Discussion

Incorporation of FOS/inulin in the diet of animals increased the cecal weight ($P < 0.05$), confirming previous results indicated by Weaver et al. (2010). This result is positive since it indicates that the food matrix tested (PBY) promotes the same effects as FOS/inulin commercialized when reaching the cecum.

Boyle et al. (2008), when feeding rats with different FOS concentrations (0%, 0.55%, 1.65%, 4.96% and 9.91%), also found a significant increase in cecal weight with increase of the dose supplemented. This increase was associated with the trophic effect of SCFA on the colonocytes. In this study, FOS was used in its purified form, whereas in the present study the FOS/inulin is part of the PBY. Nevertheless the increase in cecal weight was dose-dependent as expected.

FOS and inulin, molecules soluble in water, are likely to be fermented when reaching the cecum (Roberfroid, 2005) and thus promote an increase in organ weight (Tortuero et al. 1997), which is due to hypertrophy of the cell wall (Otha et al., 1998 a,b). However, the effect of complex carbohydrates in cecum hypertrophy tends to be proportional to its fermentation (Younes et al., 1996), with production of metabolites that stimulate cell proliferation and not only the

simple accumulation of substrates in the cecum. The bacterial fermentation also induces increased water content and in the intestinal lumen for dilution of the contents and maintenance of the osmotic pressure (Topping, 1996; Le Blay et al., 1999).

The cecal weight also reflects the water retention capacity (Weaver et al., 2010), since prebiotics such as inulin and FOS present an osmotic effect, which in turn is suggested as one of the mechanisms responsible to stimulate paracellular transport of minerals via increased mineral solubilization promoted by the greater amount of liquid in the large intestine. It is also believed that these non-digestible carbohydrates partially promotes hypertrophy or increase permeability of intestinal epithelial cells by the water retention capacity which creates a reservoir of nutrients with consequent change in the intestinal microflora, which can also influence the absorption of minerals (Bongers et al., 2003).

The water retention capacity refers to the ability to retain water in the food matrix (Robertson and Eastwood, 1981). The format of the molecule and its solubility (dispersion) in water are key-features that control its water retention capacity. These properties are also influenced by particle size. Fibers from fruits and vegetables tend to bind more to water than the fibers of cereals. It was originally suggested that dietary components with a large water retention capacity would have an effect on the generation of feces volume (McConnell et al., 1979; Roberfroid, 2005).

Because inulin and fructooligosaccharide molecules are soluble in water and rich in hydroxyl they have an osmotic action, which in turn results in the laxative effect observed with ingestion of high doses (Nilsson and Björck, 1988). The laxation effect of fructan prebiotics was demonstrated in a study in which eight subjects received 15g of oligofructose for 45 days. This amount significantly increased the average fecal weight (136g -154g) (Gibson et al., 1995)

Healthy subjects who received a daily dose of 4.0 g of lactulose, a disaccharide prebiotic (Magalhães et al., 2011), also described an increased fecal moisture content when compared to the control (Mizota, 1996).

In the present study an increased fecal moisture content was observed when prebiotic concentrations (FOS/inulin) was increased in the diet of rats.

The fecal score is used to assess the feces characteristics, such as consistency, shape and moisture content (Flickinger et al., 2003; Veronesi, 2003). In the present PBY study the experimental groups that received 7.5% and 10% FOS/inulin in their diet, the occurrence of feces consistency loss and the greater volume of fecal content was observed daily. However, not all animals in the groups receiving 7.5% and 10% presented watery feces (score = 3). This reinforces the fact that there are interindividual differences in tolerance to a single dose of FOS/inulin.

According to Vrese and Marteau (2007), diarrhea indicates increased liquidity or decreased consistency of the feces, normally associated with an increase in feces frequency and weight. The World Health Organization (WHO, 2011) defines diarrhea as three or more watery stools in two or more consecutive days.

In the present study, the occurrence of persistent diarrhea was verified (WGO, 2008) in the two groups receiving the highest FOS/inulin concentrations (7.5% and 10%), since the episodes of watery stools, characteristics of diarrhea, lasted more than 14 days.

The fecal volume and scores are directly influenced by the food composition (Meyer et al., 1999). Furthermore it has also been observed that an increase in the weight of the excreted fecal content of mice fed FOS is related to the increased number of bacteria resulting from their extensive fermentation (microbial biomass) (Roberfroid, 1999).

One of the main functions of the large intestine is to ferment oligo- and polysaccharides (especially those non-digestible) and proteins that are not completely digested in the small intestine. Fermentation products of non-digestible carbohydrates are short chain fatty acids (SCFA) (acetic, propionic and butyric acids), gases (H_2 and CO_2) and bacterial biomass. Most of the SCFA are absorbed and provide energy to the host. They can also contribute to the regulation of metabolic pathways (Roberfroid, 2005).

The production of SCFA from fermentation of non-digestible carbohydrates is an important nutritional factor. They may reduce the risk of developing gastrointestinal disorders (Wong et al., 2006), cancer (Poulsen et al., 2001) and bone disease (Weaver et al., 2010).

In this study the quantification of SCFA (anionic form) in the cecal contents showed numerically lower concentrations of acetate, propionate and

butyrate in the group receiving the highest concentration of FOS/inulin (10%). It is speculated that in this group the SCFA content was more diluted due to the higher water retention in the cecum.

The group which received 6% FOS/inulin in the diet showed numerically higher concentrations of acetate, propionate and butyrate, suggesting that this is the best content of FOS/inulin among those tested in this study for incorporation into the diet of Wistar rats without causing the undesired effect of diarrhea. Consistent with this result, this group also presented the lowest cecal pH due to higher acidification promoted by SCFA present in the cecal compartment.

The group which received 5% FOS/inulin presented an acetate concentration ($45.42 \mu\text{mol.g}^{-1}$) similar to that found by Weaver et al. (2010) of $55.90 \mu\text{mol.g}^{-1}$ and higher values for butyrate ($32.56 \mu\text{mol.g}^{-1}$) and propionate ($40.36 \mu\text{mol.g}^{-1}$). In indicated study which the values obtained were $11.70 \mu\text{mol.g}^{-1}$ and $20.30 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectively. Unlike the present study, Weaver et al. (2010) worked with purified FOS/inulin.

Havenaar (2011) pointed out that SCFA are vital to the health and well-being of the host and that the presence of carbohydrates from dietary fiber or prebiotics is essential to promote metabolic activity in the colon. The prebiotics FOS/inulin are substrates that stimulate the production of SCFA.

Moreover, FOS and inulin, as well as all food substrates which are fermented in the large intestine, when consumed in large quantities can cause intestinal discomfort such as bloating and abdominal distension due to the formation of gases as inevitable products of fermentation. They can also promote laxative action and may cause diarrhea because of the osmotic effect, already mentioned. These factors discourage consumption of high doses of these prebiotics (Cummings and Macfarlane, 2002; Roberfroid, 2005) and deserve more attention from the scientific community.

In rats treated with 1,2-dimethylhydrazine, the histogram of the width could be approximated as a normal distribution. With the average $\pm 2\text{SD}$ ($\mu+2\sigma$) generally considered as the normal range. Then, crypts smaller than ($\mu+2\sigma = 85.6 \mu\text{m}$) would be judged as normal and those larger than this as aberrant (morphologically irregular crypts i.e., likely to develop malignant intestinal tumors) ($\mu+2\sigma > 115 \mu\text{m}$) (Tsukamoto et al., 2001). In the present study the presence of FOS/inulin of the PBY did not have an adverse effect on this

variable. As shown in Table 4, the values were between 27µm and 53µm, therefore, maintained within safe measures.

Rémésy et al. (1993) reported an increase in depth and number of cells per crypt in rats fed diets supplemented with 15% purified inulin. Lobo et al. (2007) evaluated the morphology of cecal mucosa in growing Wistar rats fed diets supplemented with yacon flour (7.5% FOS) and showed that the consumption of yacon resulted in a significant positive change ($P < 0.05$) in cecal histology, with an increase in crypt depth and number of crypts per microscopic field.

In the study performed by Genta et al. (2005), histological changes were observed in the cecum of the group of animals receiving one FOS yacon syrup dose of 6800 mg.kg⁻¹ body weight per day (high dose), which showed a cecum hypertrophy with increased epithelial cell size and no signs of cell swelling.

5. Conclusions

This study indicated that the consumption of PBY with FOS/inulin concentrations greater than 6% caused osmotic diarrhea, associated with increased relative cecum weight and fecal moisture content, weight and score. Moreover, in the groups receiving 7.5% and 10% FOS/inulin, the content of SCFA was lower compared to the other groups, possibly because they are diluted due to increased water retention in the cecum. These findings refer to a collateral effect of the fermentation of inulin-type fructans, which make up the various positive effects expected with dietary intervention by means of these prebiotics.

Given the above, the consumed of the PBY in concentrations of 6% FOS/inulin might be incorporated in the diet, it is well tolerated and does not cause gastrointestinal complications. It is suggested that at this dosage it is possible to evaluate the potential benefits in the digestive tract and systemic effects arising from the consumption of FOS/inulin present in the food matrix tested (PBY).

6. References

Association of the Agricultural Chemists - Official Methods of Analysis - AOAC. (1997). 16th ed. v.2. Gaitherburg: Association of Official Analytical Chemists, USA.

Aybar M, Sánchez Riera AN, Grau A, Sánchez SS. (2001). Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yácon) leaves in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 74: 125-132.

Bongers A, Van Den Heuvel EGHM. (2003). Prebiotics and the bioavailability of minerals and trace elements. *Food Rev Int* 230: 536-542.

Bouhnik Y. et al. (1999). Short-chain fructooligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 129:113-116.

Boyle FG. et al. (2008). Safety evaluation of oligofructose: 13 Week rat study and in vitro mutagenicity. *Food Chem Toxicol* 46: 3132-3139.

Campbell JM, Fahey GC, Wolf BW. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* 127: 136-140.

Chen HL. et al. (2000). Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *Nutr Res* 20:1725-33.

Cummings JH, Macfarlane GT. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *Brit J Nutr* 87: S145–S151.

Devareddy L. et al. (2006). The effects of fructo-oligosaccharides in combination with soy protein on bone in osteopenic ovariectomized rats. *Menopause* 13: 692-699.

Flamm G. et al. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit Rev Food Sci* 41: 353-362.

Flickinger EA. et al. (2003). Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *J Anim Sci* 81:2008-2018.

Freitas LS. et al. (2006). Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade. *Rev Bras Zootecn* 35: 1711-1719.

Genta S. et al. (2005). Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food Chem Toxicol* 43: 1657-65.

Genta S. et al. (2009). Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clin Nutr* 28:182-187.

Geyer M. et al. (2008). Effect of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Colonic Transit Time in Healthy Volunteers. *Digestion* 78:30-33.

Gibson GR. et al. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108:975-982.

- Gibson GR, Roberfroid MB. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* v.125: 1401-1412.
- Gibson GR. (2008). Prebiotics as Gut Microflora Management Tools. *J Clin Gastroenterol* 42: S75-S79.
- Goto K. et al. (1995). Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Biosci Biotech Bioch* 59: 2346-2347.
- Havenaar R. (2011). Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. *Beneficial Microbes* 2:103-14.
- Kaneko T, Kudo T, Horikoshi K. (1990). Comparasion of CD composition produced by chimeric CGTases. *Agr Biol Chem Tokyo*. 54: 197-201.
- Kelly G. (2009). Inulin-Type Prebiotics: A Review (Part 2). *Alternative Medicine Review* 14: 36-55.
- Kruger MC. et al. (2003). The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol and Medicine* 228:683–8.
- Le Blay G. et al. (1999). Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J Nutr* 129: 2231-2235.
- Lobo AR. et al. (2007). 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. *Brit J Nutr* 97: 776–785.
- Lobo A.R. et al. (2009). Changes in bone mass, biomechanical properties and microarchitecture of calcium- and iron-deficient rats fed diets supplemented with inulin-type fructans. *Nutr Res* 29: 873-881.
- Lobo AR. et al. (2011). Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour. *Food Chem* 126: 885-891.
- Magalhães M.S. et al. (2011). Terminology: Funcional foods, probiotcs, prebiotcs, synbiotcs, health claims, sensory evaluation foods and molecular gastronomy. Turku, Finland: Functional Foods Forum.
- Mcconnell AA, Eastwood MA, Mitchell WD. (1974). Physical characteristics of vegetal foodstuffs that could influence bowel function. *J Sci Food Agr* 25: 457–1464.
- Meyer H, Zentek J, Hobernoll H. (1999). Digestibility and compatibility of mixed diets and fecal consistency in diferente breeds of dog. *J Vet Med* 46: 155-165.
- Mizota T. (1996). Lactulose as a growth promoting fator for *Bifidobacterium* and its physiological aspects. *Bull Inte Dairy Fed* 313: 43-48.

Nilsson U, Björck I. Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal Tract. *J Nutr* 118: 1482–1486.

Niness KR. (1999). Inulin and Oligofructose: what are they? *J Nutr* 129: 1402S-1406S.

Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends Food Sci Tech* 22: 40-46.

Otha A. et al. (1998a). Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin-D9k in the large intestine of gastrectomized rats. *Scand J Gastroentero* 33:1062-1068.

Otha A. et al. (1998b). Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9K differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. *J Nutr* 128: 934-939.

Ohta A. et al. (2002). A Combination of Dietary Fructooligosaccharides and Isoflavone Conjugates Increases Femoral Bone Mineral Density and Equol Production in Ovariectomized Mice. *J Nutr* 132: 2048–2054.

Pedreschi R. et al. (2003). Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. *J Agr Food Chem* 51: 5278-5284.

Poulsen M, Mølck AM, Jacobsen BL. (2001). Different effects of short- and long-chained fructans on large intestinal physiology and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Nutr Cancer* 42: 194–205.

Rémésy C. et al. (1993). Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *Am J Physiol* 264: G855-G862.

Roberfroid MB. (1999). Dietary fiber properties and health benefits of non-digestible oligosaccharides. In: Sungsoo S, Prosky L, Dreher M. *Complex carbohydrates in foods*. Cap 4: 25-34.

Roberfroid MB (2005). *Inulin-type fructans - functional food ingredients*. Florida, United States of America: CRC Press.

Roberfroid MB. (2005). Introducing inulin-type fructans. *Brit J Nutr* 93: S13–S25.

Robertson JA, Eastwood MA. (1981). A method to measure the water-holding properties of dietary fibre using suction pressure. *Brit J Nutr* 46: 247–255.

Scholz-Ahrens KE, Açil Y, Schrezenmeir J. (2002). Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *Brit J Nutr* 88: 365–377.

Sgarbieri VC, Pacheco MTB. (1999). Revisao: alimentos funcionais fisiologicos. *Braz J Food Tech* 2: 7-19.

Smiricky-Tjardes MR. et al. (2003). Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. *J Anim Sci* 81: 2535-2545.

Tooping DL. (1996). Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. *Asia Pac J Clin Nutr* 5:15-19.

Tortuero F, Fernández E, Rupérez P. et al. (1997). Raffinose and lactic acid bacteria influence caecal fermentation and serum cholesterol in rats. *Nutr Res* 17: 41-49.

Tsukamoto T. et al. (2001). Hexosaminidase-altered aberrant crypts, carrying decreased hexosaminidase α and β subunit mRNAs, in colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Jpn J Can Res* 92: 109-18.

Veronesi C. (2003). Efeito de dois alimentos comerciais secos no consumo energético, peso vivo e peso metabólico, escore corporal, escore e peso fecal de cães adultos em manutenção e atividade. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Vrese M, Marteau PR. (2007). Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *J Nutr* 137: 803S-811S.

Weaver CM. et al. (2010). Novel Fibers Increase Bone Calcium Content and Strength beyond Efficiency of Large Intestine Fermentation. *J Agr Food Chem* 58: 8952–8957.

Wong JM. al. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40: 235-43.

World Health Organization- WHO. Health topics – Diarrhoea. Available at: <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>. Accessed on 25 november 2011.

World Gastroenterology Organization - WGO. Practice Guidelines: Acute diarrhea; 2008. Available at: http://www.omge.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/01_acute_diarrhea.pdf. Accessed on 25 november 2011.

Yildiz S. (2011). The Metabolism of Fructooligosaccharides and Fructooligosaccharide-Related Compounds in Plants. *Food Rev Int* 27:16-50.

Younes H, Demigné C, Remésy C. (1996). Acidic fermentation in the caecum increases absorption and calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *Brit J Nutr* 75: 301-314.

Zafar TA. et al. (2004). Nondigestible Oligosaccharides Increase Calcium Absorption and Suppress Bone Resorption in Ovariectomized Rats. *J Nutr* 134: 399–402.

5.2. ARTIGO: – Experimento – Fase 1

Produto a base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) contribui favoravelmente ao metabolismo ósseo de ratas *Wistar*

RESUMO

Objetivo

Avaliar o efeito da intervenção dietética com 6% de FOS/Inulina de um produto a base de yacon nas propriedades relacionadas ao metabolismo ósseo, em ratas *Wistar*.

Métodos

Foram utilizadas 16 ratas (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da raça *Wistar*, recém-desmamadas. O experimento (90 dias) foi realizado por meio de Delineamento Inteiramente Casualizado, sendo administrado aos animais dieta controle (n=8) e dieta acrescida da dose de prebiótico PBY (contendo 6% de FOS/Inulina). Foram avaliadas, de acordo com protocolos padronizados, as variáveis: ganho de peso (GP); consumo alimentar (CA); coeficiente de eficiência alimentar (CEA); peso relativo do ceco (PRC); pH cecal; ácidos orgânicos; densidade e conteúdo mineral ósseo; propriedades biomecânicas do fêmur; níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) e telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTx); absorção, balanço e retenção de cálcio corporal. O nível de significância estatística foi $P < 0,05$ pelo teste *t*.

Resultados

O GP foi maior no grupo controle (C); o CA, PRC, lactato foram maiores no grupo PBY ($P < 0,05$). A força máxima e rigidez na cabeça do fêmur foram percentualmente maiores no grupo PBY da mesma forma que as concentrações de cálcio, fósforo e magnésio nas tíbias. Os níveis de FA e NTx não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$). A excreção fecal de cálcio foi maior no grupo C ($P < 0,05$) e a absorção aparente fracional, absorção aparente, balanço mineral de cálcio e retenção mineral foram percentualmente maiores no grupo PBY.

Conclusão

Conclui-se que a exposição de ratas a dose de 6% de FOS/Inulina de um produto a base de yacon, por um período de 90 dias, apresentou efeitos clínicos promissores em relação a maior produção de acetato e lactato; a menor excreção de cálcio fecal; e maior absorção aparente fracional, maior absorção aparente (%), maior balanço mineral e maior percentual de retenção de cálcio.

Estes resultados presumem impacto positivo, a longo prazo, no metabolismo ósseo.

Termos de indexação: Ratas. Yacon. Retenção Mineral. Biomecânica óssea.

INTRODUÇÃO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa de origem andina, fonte de compostos bioativos como inulina e frutooligossacarídeos (FOS) (Genta et al., 2009; Ojansivu et al., 2011), os quais apresentam efeitos promissores potenciais no metabolismo ósseo (Legette et al., 2012; Rodrigues et al., 2012) .

Após consumo, FOS e inulina são seletivamente fermentados no cólon por um grupo de bactérias benéficas, as quais (especialmente os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) melhoram a função gastrointestinal (Pedreschi et al., 2003), gerando ácidos orgânicos como lactato e outros ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico (Gibson e Roberfroid, 1995; Geyer et al., 2008), que atuam melhorando a biodisponibilidade de cálcio (Scholz-Ahrens et al., 2007; Sant'Anna et al. 2012) e conseqüentemente a estrutura óssea (Lobo et al., 2006; Cashman, 2007; Lobo et al., 2007 e Saulnier et al., 2009).

A vida de prateleira do yacon é limitada devido ao elevado conteúdo de água sendo que *in natura* não é possível encontrá-lo durante todo o ano. Assim foi desenvolvido um produto à base de yacon – PBY. Este produto é mais estável quimicamente e de armazenamento prolongado, sem alterações significativas no perfil de carboidratos, favorecendo assim acesso contínuo a esta fonte de prebióticos.

Neste sentido, este estudo tem perfil inovador voltado a análise da intervenção dietética com PBY e o seu efeito em diferentes indicadores da saúde óssea de ratas *Wistar*.

MÉTODOS

O produto à base de yacon testado foi desenvolvido no Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA/UFV, no entanto a descrição do seu desenvolvimento deve ser resguardada devido as exigências da solicitação de patente (INPI: 014110002964).

As análises dos teores de carboidratos não digeríveis, inulina e FOS do produto desenvolvido foram realizadas no CERAT – Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu-SP. As concentrações de FOS e inulina foram mensuradas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme metodologia de Kaneko et al. (1990), com uma coluna BIO-RAD HPX 87P (fase estacionária de chumbo), utilizando água purificada como fase móvel. As amostras foram diluídas (1 g em 100 mL de água destilada), centrifugadas a 11.269 x g, e, em seguida, filtradas através de uma membrana de decafluoreto (PVDF) da polivinil Millipore com 0,22 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro. As amostras foram então injetadas em cromatógrafo de alta eficiência (HPLC) (Varian, ProStar 410 HPLC Auto Sampler; Varian Inc, USA) com detector de índice de refração e injetor automático, com as seguintes condições de operação: taxa de fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de coluna 85 °C.

Nos grupos que receberam a intervenção com dieta teste foram utilizados a dose de 6,0% de FOS/inulina do produto à base de yacon (PBY), dose esta que foi escolhida após direcionamento obtido por meio do experimento previamente realizado.

Foram utilizadas 16 ratas (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da raça *Wistar*, recém-desmamadas (30 dias de idade) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de temperatura (22±2°C) e luz controladas, em fotoperíodo de 12 horas e receberam água deionizada *ad libitum*. O período experimental correspondeu a 90 dias.

O experimento foi realizado por meio de Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), sendo administrado aos animais dieta de crescimento AIN-93G (Reeves et al., 1993) (n=8) e dieta acrescida de dose de prebiótico PBY (contendo 6% FOS/inulina) (n=8). Os pesos dos animais e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente.

Foi avaliado o balanço de cálcio (Balanço= Cálcio ingerido – Cálcio Fecal – Cálcio Urinário) e as percentagens de retenção (% Retenção = Balanço/Cálcio ingerido) e de absorção de Cálcio (% Absorção= Cálcio ingerido – Cálcio Fecal/Cálcio ingerido) (Costa, 2008). Na semana anterior ao final do experimento, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas por 24 horas

para quantificar a ingestão da dieta e coletar fezes e urina, a fim de se determinar o balanço.

Nesse período foram fornecidos, em média 22 g de dieta por dia e ao final de 24 horas, as sobras foram pesadas nos comedouros. Foi calculada a média diária de dieta consumida pelos animais para ser utilizada no cálculo do balanço de cálcio. Uma dieta adicionada de carmin foi oferecida com o objetivo de marcar as fezes. No primeiro dia do período delimitado para realização do balanço, foi colocada dieta marcada com carmin. Nos dois dias seguintes foram oferecidas as dietas sem marcação e, no quarto dia retornou-se com a dieta marcada com carmin (Lobo, 2007; Franco, 2009).

O conteúdo de cálcio ingerido foi determinado pela média da quantidade de dieta consumida pelos animais no período de avaliação (quatro dias) considerando o teor desse mineral presente na dieta (0,5%) (Franco, 2009; Junior, 2009).

As fezes foram coletadas em quatro dias. No segundo dia foram coletadas as fezes marcadas com carmin e, no quinto dia foram coletadas as fezes não marcadas. O conteúdo total de fezes foi quantificado e dividido por quatro para se obter a média diária (Franco, 2009).

O volume de urina de 24 horas foi completado para 10 mL de água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2865 x g. Após a centrifugação foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20µL/mL) (Franco, 2009).

Alíquotas das fezes e do sobrenadante da urina centrifugada foram digeridas em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluídas em água deionizada para posterior determinação de cálcio (Silva, 1990; AOAC, 1997).

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por uma overdose de dióxido de carbono (Mezadri et al., 2004) para proceder as análises subsequentes. Para avaliação física e química dos ossos, os membros inferiores foram desarticulados e passaram por remoção completa dos tecidos moles, de forma que em sequência as tíbias e os fêmures fossem pesados, identificados e acondicionados (-20°C), até o momento das análises (Lobo et al., 2009; Fernandes, 2010). Foi feita a incisão da cavidade torácica para coleta de sangue, por punção cardíaca, para proceder às análises dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.

O ganho de peso corporal foi determinado pela diferença entre os pesos no dia da eutanásia e o do primeiro dia de experimento. Foi calculado o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) (Franco, 2009): $CEA = \text{ganho de peso (g)} / \text{consumo alimentar (g)}$.

As amostras de conteúdo cecal, foram coletadas em sacos plásticos estéreis de polietileno da marca Whirl-Pak (Nasco Whirl-Pak[®]; Nasco, USA) com capacidade de 100mL. Após a retirada do conteúdo cecal, foi realizada a determinação do pH em pHmetro digital, devidamente calibrado (Teshima, 2001; Guigoz et al., 2002). O ceco foi pesado e determinado o peso relativo: $\text{peso do ceco (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$.

Para determinação dos ácidos orgânicos: ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta - AGCC (ácido acético, propiônico e butírico) foi utilizado método descrito por Smiricky-Tjardes et al. (2003). As amostras do conteúdo cecal foram adicionadas de 500 μL de ácido meta-fosfórico a 25%, em tubo para microcentrifugação com posterior agitação em vortex (Velp Scientifica[®], Infrared Vortex Mixer WX; Velp Scientifica, Italy) por 30 segundos, mantidas em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). Após esse período, foram centrifugadas em micro centrífuga refrigerada (Centrifuge, model 5804 R; Eppendorf do Brasil, São Paulo-SP) a $14.262 \times g$, por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para microcentrifugação sendo novamente centrifugado por 20 minutos, nas mesmas condições descritas anteriormente. Feito isso, o sobrenadante correspondente a cada amostra foi separado em frascos individuais, onde adicionou-se mais 400 μL de ácido meta-fosfórico a 25% seguindo-se congelamento a -20°C .

As amostras foram analisadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em cromatógrafo SHIMADZU (SPD-10AVP, (SHIMADZU do Brasil, São Paulo-SP), acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se comprimento de onda de 210 nm; coluna C18 (fase inversa) da marca BIORAD (Bio-Rad Laboratories Brazil, Rio de Janeiro), com 30 cm x 4.5 mm de diâmetro, fluxo na coluna de 0,6 mL/minuto (AGCC) e de 0,4 mL/minuto (ácido láctico), pressão na coluna de 123 Kgf/cm^2 (AGCC) e de 102 Kgf/cm^2 (ácido láctico); fase móvel: água em 1% de Ácido Orto Fosfórico e volume injetado de 20 μL .

As análises de cálcio, magnésio e fósforo (nas tíbias) foram realizadas pelo método de digestão ácida, em bloco digestor, com 10 mL dos ácidos

nítrico (HNO_3) e perclórico (HClO_4) na proporção 3:1. Para a análise do conteúdo mineral dos ossos adicionou-se a solução ácida, previamente mencionada, e os tubos foram mantidos em capela de exaustão de gases por aproximadamente 6 horas até que as tíbias estivessem totalmente dissolvidas (Franco, 2008; Rodrigues, 2012).

Os tubos de ensaios foram aquecidos por 16 horas no bloco digestor a uma temperatura variando entre 80 e 160°C. A cada 20 minutos a temperatura foi elevada progressivamente em 20°C até alcançar 160°C. Após as primeiras 8 horas de digestão, foram adicionados 5 mL de solução ácida ($3\text{HNO}_3 + 1\text{HClO}_4$) para evitar que a solução secasse. Ao final da digestão, os tubos permaneceram na capela de exaustão, resfriando a temperatura ambiente. Após esta etapa, o conteúdo do tubo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água deionizada. Deste balão volumétrico retirou-se uma alíquota para a leitura dos minerais.

Posteriormente, para as análises de cálcio e magnésio, ao material digerido foi adicionado 5 mL (10%) de solução de cloreto de estrôncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Todo o material utilizado (vidraria, recipientes de plástico), para a análise dos minerais mencionados, foi submetido previamente a lavagem em água corrente e detergente neutro, imersão por 24 horas com detergente seguida de enxágue com água deionizada, imersão em solução de ácido nítrico (HNO_3) a 10% por 24 horas, seguido de enxágue com água deionizada, e secagem em estufa (Franco, 2009).

Os minerais (cálcio, magnésio e fósforo) foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Varian - Agilente, SpectrAA 220FS - Fast Sequencial, Austrália), do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa/UFV.

As análises dos biomarcadores ósseos de formação (Fosfatase Alcalina) e reabsorção (Telopectídeo Aminoterminal do Colágeno tipo I) foram realizadas utilizando Kits comerciais. Para análise da Fosfatase Alcalina foi utilizado o Kit da marca Bioclin. As amostras foram hidratadas com 200 μL de NaCl 0,9%, sendo feito a leitura em aparelho analisador multiparamétrico para análises bioquímicas (Alizé B.652; Lisabio, France). Os níveis séricos de Telopectídeo Aminoterminal do colágeno tipo I (NTx) foram avaliados por meio de ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) da marca

USCNK – Life Science Inc. A leitura da placa foi realizada em equipamento leitor de microplaca (Versa max, microplate reader).

A análise da Densidade Mineral Óssea (DMO) no fêmur foi realizada em Densitômetro Ósseo de Raios-X (LUNAR DPX-ALPHA), na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, SP.

A análise da resistência óssea foi realizada no mesmo fêmur, logo após a análise da DMO (Fernandes, 2010). O osso foi submetido a ensaio mecânico em máquina universal de ensaio (EMIC®, modelo DL 3000), do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia da UNESP, Araçatuba-SP, com carga aplicada a uma velocidade de 5mm/min. Um sistema computadorizado acoplado ao aparelho registra a força (carga) e o deslocamento, permitindo obter o valor da força referente a cada deslocamento. A aquisição destes pontos foi realizada em intervalos padronizados de tempo definidos pelo programa. A análise foi realizada tanto no colo do fêmur (com predomínio do osso esponjoso) como também no terço médio da diáfise (com predomínio do osso cortical).

Foi realizado ensaio de flexão na cabeça do fêmur, com a amostra fixada em um aparato mecânico ficando em posição vertical. A cada incremento de carga aplicada ao material o computador automaticamente registrou a deformação correspondente, para, depois ser construído o gráfico carga *versus* deformação, a partir do qual pode-se obter: força máxima (maior força aplicada à amostra) e rigidez (dada pela inclinação da curva na fase elástica). Também foi avaliada a tenacidade das amostras, que corresponde à energia absorvida pelo corpo, obtida pelo cálculo da área sob a curva carga *versus* deformação até o ponto de ruptura da amostra.

Na diáfise femural, para melhor simular efeito da força de compressão exercido pelo corpo, foi utilizado um bloco obtido dessa região do fêmur, procedendo-se da seguinte maneira: foi utilizada uma estrutura metálica e borracha, ambos de aproximadamente 5 mm de largura e 20mm de comprimento. Apertou-se a estrutura com alicate de modo que ele se fechasse. Com uma pinça Halsted (mosquito) prendeu-se o osso pela estrutura. Segurou-se a pinça e usou-se o dedo como apoio e passou-se o osso por uma serra elétrica, de ambos os lados. Com a própria pinça retirou-se o osso cortical. Em seguida obteve-se a imagem do bloco obtido e realizou-se o ensaio de flexão

em aparelho Universal de Ensaio EMIC[®] acoplado a um computador, conforme supracitado.

Com as imagens dos blocos obtidos utilizou-se o programa Image J, de domínio público (<http://rbs.info.nih.gov/ij>), por meio do qual calculou-se a área para as variáveis de interesse.

As análises estatísticas foram realizadas no software SAS[®] (*Statistical Analysis System* – SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1989) versão 9.1 licenciado para a Universidade Federal de Viçosa. Considerou-se um nível de significância de 5% para todas as análises.

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa com animais da Universidade Federal de Viçosa, parecer nº 55/2011.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato na literatura que descreve os efeitos de um produto a base de yacon (PBY) em propriedades relacionadas ao metabolismo ósseo em ratas *Wistar*.

Observou-se maior ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar no grupo controle, embora o consumo alimentar total tenha sido maior nos animais que consumiram o PBY ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Ganho de peso corporal (GP), consumo alimentar total (CA) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratas ($n=8$ /grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo C) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY).

Variável	Grupo experimental		P*
	C	PBY	
GP(g)	182,87 ± 27,95 ^a	142,00 ± 19,25 ^b	0,0113
CA (g)	1713,99 ± 157,49 ^a	1940 ± 106,85 ^b	0,0119
CEA	0,10 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,0005

* Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média ± desvio padrão seguidos de letras diferentes na mesma linha, quando comparados, diferiram estatisticamente.

O desempenho dos animais refletiu um paradoxo, uma vez que o grupo PBY apresentou maior consumo alimentar e menor ganho de peso. Isto evidenciou-se devido ao fato da dieta contendo o produto a base de yacon ter um menor valor calórico que a dieta controle, pela presença de maior conteúdo de fibras solúveis no PBY. De acordo com cálculo proposto por Roberfroid et al. (1993), o valor calórico da dieta controle foi de 385,28 kcal/100g de dieta, enquanto a dieta contendo PBY apresentou valor calórico de 367,28 kcal/100g.

O peso relativo do ceco foi maior ($P < 0,05$) no grupo que recebeu dieta contendo PBY (Tabela 2).

Tabela 2. Peso relativo do ceco (PRC), pH cecal e ácidos orgânicos de ratas ($n=8$ /grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo C) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY).

Variável	Grupo experimental		P *
	C	PBY	
PRC	0,0035 ± 0,0008 ^a	0,0048 ± 0,0006 ^b	0,0101
pH cecal	6,76 ± 0,23 ^a	6,72 ± 0,26 ^a	0,7903
Acetato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	37,99 ± 20,76 ^a	41,74 ± 29,54 ^a	0,7778
Butirato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	31,49 ± 17,72 ^a	28,78 ± 13,35 ^a	0,7400
Propionato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	12,59 ± 8,55 ^a	11,15 ± 5,01 ^a	0,6927
Lactato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	1,23 ± 0,58 ^a	3,24 ± 1,39 ^b	0,0072

* Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média ± desvio padrão seguidos de letras diferentes na mesma linha, quando comparados, diferiram estatisticamente.

O maior peso cecal no grupo de animais que receberam PBY na alimentação é um indicativo da retenção de água promovida pelo efeito osmótico dos prebióticos. Este efeito promove estímulo ao transporte paracelular de minerais, por aumentar a solubilização mineral em um volume maior de líquido no intestino grosso (Bongers et al., 2003).

A concentração de lactato ($P < 0,05$) foi significativamente maior (62,03%) no grupo que recebeu a dieta com PBY. O que sugere maior atividade de bactérias bífidas em consequência do estímulo advindo da dieta contendo PBY. Entre os ácidos graxos de cadeia curta, a concentração de acetato foi 9,87% maior no grupo PBY, o que também indica atuação de bactérias bífidas.

Verificou-se que a excreção fecal de cálcio foi maior (26,16%) no grupo que recebeu dieta controle (P<0,05) (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo de cálcio na urina e fezes, absorção aparente fracional, balanço mineral de cálcio e % retenção mineral de ratas (n=8/grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo C) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY).

Variável	Grupo experimental		P *
	C	PBY	
Conteúdo de cálcio ingerido (mg/dia)	110,44 ± 7,22 ^a	106,15 ± 10,80 ^a	0,3806
Cálcio urinário (mg/dia)	19,15 ± 11,47 ^a	19,05 ± 10,64 ^a	0,9868
Cálcio fecal (mg/dia)	31,23 ± 8,55 ^a	23,06 ± 3,04 ^b	0,0383
Absorção aparente fracional (mg/dia)	79,22 ± 10,48 ^a	83,09 ± 12,55 ^a	0,5247
Absorção aparente (%)	71,66 ± 7,85 ^a	77,98 ± 4,06 ^a	0,0832
Balanço mineral de cálcio (mg/dia)	60,07 ± 12,51 ^a	64,03 ± 10,59 ^a	0,5159
% Retenção mineral	54,57 ± 11,54 ^a	60,27 ± 8,05 ^a	0,2895

* Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média ± desvio padrão seguidos de letras diferentes na mesma linha, quando comparados, diferiram estatisticamente.

Absorção aparente fracional: Conteúdo de cálcio ingerido (mg) – conteúdo de cálcio excretado nas fezes (mg);

Absorção aparente %: [Conteúdo de cálcio ingerido (mg) – conteúdo de cálcio excretado nas fezes (mg)/ Conteúdo de cálcio ingerido (mg)] x 100;

Balanço mineral de cálcio: [Conteúdo de cálcio ingerido (mg) – (conteúdo de cálcio excretado nas fezes (mg) + conteúdo de cálcio excretado na urina (mg))];

% Retenção mineral: [Balanço mineral de cálcio/Conteúdo de cálcio ingerido (mg)] x 100.

A menor excreção fecal de cálcio no grupo PBY sugere maior biodisponibilidade do mineral devido aos compostos bioativos (FOS e inulina) presentes no produto a base de yacon.

Embora sem diferença significativa, a absorção aparente fracional, absorção aparente percentual, balanço mineral e percentual de retenção de cálcio apresentaram-se como 4,88%, 8,81%, 6,59% e 10,44, respectivamente, maiores no grupo PBY do que no grupo controle. Isto representa um indicativo favorável, clinicamente, em termos de absorção de cálcio (Tabela 3).

O teor de fibras em amostra de PBY mostrou predominância de fibra solúvel, sendo que 19,69% foram identificadas como sendo FOS (14,95%) + inulina (4,74%) por detecção em HPLC. Pelo método enzimático gravimétrico foram detectadas 2,75% de outras fibras solúveis totalizando 22,44% de fibras

solúveis. As fibras insolúveis encontradas foram de 1,79%. As fibras solúveis favorecem a absorção mineral pelo efeito prebiótico que promovem no ceco com conseqüente redução de pH colônico e maior solubilização do cálcio.

Os valores de cálcio, magnésio e fósforo não diferiram estatisticamente entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Conteúdo Mineral Ósseo (n=8/grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo C) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY).

Variável	Grupo experimental		P *
	C	PBY	
Peso ósseo - Tíbia (g)	0,59 ± 0,04 ^a	0,67 ± 0,11 ^a	0,1475
Cálcio (%)	18,74 ± 3,29 ^a	22,05 ± 3,25 ^a	0,0826
Fósforo (%)	8,11 ± 1,16 ^a	8,77 ± 1,72 ^a	0,4032
Magnésio (%)	0,19 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,1379

* Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média ± desvio padrão seguidos de letras diferentes na mesma linha, quando comparados, diferiram estatisticamente.

Todavia, numericamente o conteúdo de cálcio no grupo PBY foi 15% maior que no grupo C, o conteúdo de fósforo mostrou-se 7% maior e o de magnésio 14%. Em termos clínicos, as maiores variações no grupo que recebeu dieta contendo prebiótico (PBY) são promissoras e podem repercutir a médio e longo prazo positivamente nas variáveis de retenção mineral e resistência óssea.

Lobo et al., 2007; 2009 e Rodrigues et al., 2012 alimentaram ratos em crescimento com farinha de yacon e constataram maior absorção e retenção de cálcio, magnésio e fósforo (P<0,05). A diferença significativa na retenção destes minerais, não detectada no presente estudo, contrasta com os anteriormente citados. O que pode ser explicado pelo fato das características intrínsecas da matriz alimentar serem diferentes bem como o tempo de experimentação.

No presente estudo o período experimental foi maior que nos estudos de Lobo et al., 2007; 2009 e Rodrigues et al., 2012. Presume-se que quando estes autores avaliaram a retenção de minerais o efeito significativo se evidenciou. Por outro lado, devido ao maior tempo de exposição teria ocorrido uma

adaptação dos animais a intervenção dietética com o produto veiculador de FOS/Inulina. Esta adaptação pode ter suprimido o efeito significativo da retenção mineral no presente estudo.

A Fosfatase Alcalina sérica não diferiu entre os grupos ($P>0,05$) (Figura 1). No grupo controle a concentração foi de $46,00 \pm 19,03$ e no grupo PBY de $37,60 \pm 17,36$.

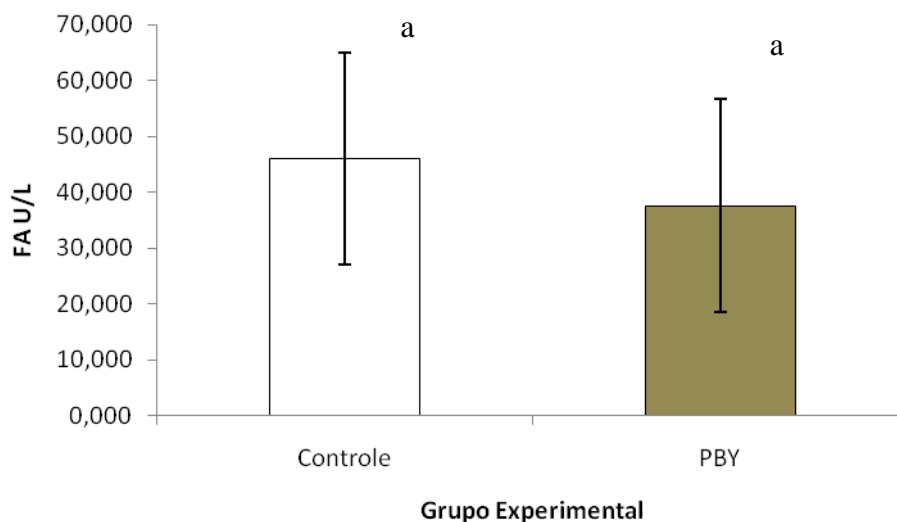


Figura 1. Conteúdo sérico de Fosfatase Alcalina de ratas ($n=5$ /grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo Controle) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média \pm desvio padrão seguidos de letras iguais, quando comparados entre barras não diferiram estatisticamente. $P=0,5064$

O grupo controle apresentou percentualmente maior valor (10,76%) para o marcador de reabsorção óssea - Telo-peptídeo aminoterminal do colágeno tipo I ($48,02 \pm 19,99$) comparado ao grupo PBY ($42,85 \pm 16,38$) (Figura 2).

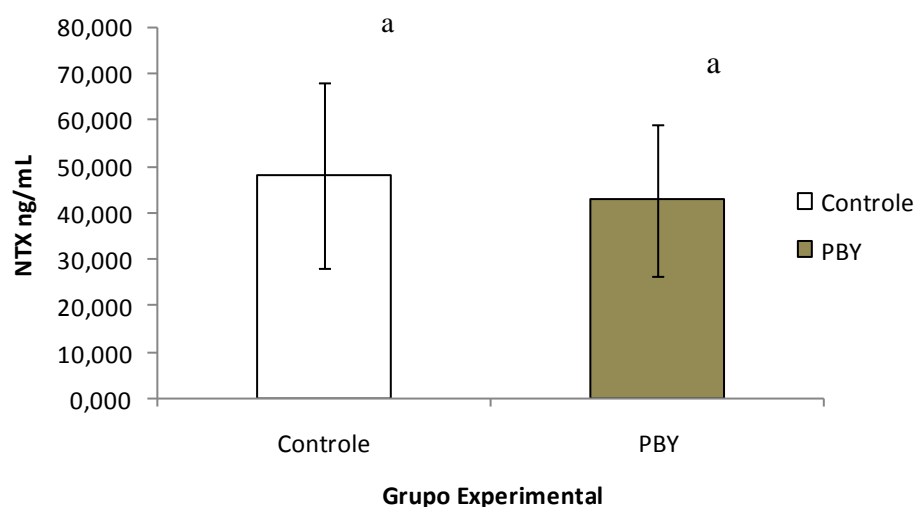


Figura 2. Conteúdo sérico de Telopectídeo N-terminal do colágeno tipo I (NTx I) de ratas (n=5/grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo Controle) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média ± desvio padrão seguidos de letras iguais, quando comparados entre barras não diferiram estatisticamente. $P= 0,6774$

Os marcadores Fosfatase Alcalina (formação óssea) e Telopectídeo N-terminal do colágeno tipo I/NTx I (reabsorção óssea), dosados no soro das ratas “intactas” (sem terem sido submetidas a nenhum procedimento cirúrgico), estão relacionados ao processo natural de remodelação óssea, que ocorre continuamente no tecido ósseo.

Os valores de comprimento do fêmur, densitometria mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO) e propriedades biomecânicas na cabeça dos fêmures das ratas não diferiram nos grupos C e PBY ($P>0,05$) (Tabela 5). Verificou-se que a força máxima e rigidez foram 3,23 e 15,06 vezes maior (percentualmente) no grupo com dieta PBY. A região da cabeça do fêmur está mais predisposta ao risco de fratura e acredita-se que também esteja quanto à responsividade à intervenção dietética.

Tabela 5. Comprimento, densitometria mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO) e propriedades biomecânicas dos fêmures de ratas (n=8/grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo C) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY).

Variável	Grupo experimental		P*	
	C	PBY		
Comprimento do fêmur (mm)	32,71 ± 1,57 ^a	32,78 ± 1,98 ^a	0,9356	
DMO (g/cm ²)	0,22 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,5379	
CMO (g)	0,26 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,04 ^a	0,5759	
Propriedades Biomecânicas da cabeça do fêmur	Força Máxima (N)	113,88 ± 22,45 ^a	117,56 ± 20,88 ^a	0,7441
	Rigidez (N.mm ⁻¹)	166,00 ± 58,68 ^a	191,00 ± 56,81 ^a	0,4214
	Tenacidade (MJ)	79,03 ± 63,62 ^a	72,76 ± 36,33 ^a	0,8155

* Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média ± desvio padrão seguidos de letras iguais na mesma linha, quando comparados, não diferiram estatisticamente.

As propriedades biomecânicas na diáfise femural não variaram (P>0,05) entre os grupos (Tabela 6). Ressalta-se que as ratas encontravam-se “intactas” e não foram expostas a nenhum procedimento invasivo, como ocorre em situações onde os animais são submetidos a um tipo de cirurgia, por exemplo.

A tendência (valores menores) detectada para os resultados das propriedades biomecânicas, da região da diáfise do fêmur, no grupo que recebeu dieta PBY pressupõe-se que esteja relacionada ao fato do tecido ósseo cortical, que predomina na diáfise, ser metabolicamente menos ativo que o tecido trabecular, que predomina na cabeça do fêmur (Zerbini e Souza, 2001). Essa característica implica na resposta biológica à intervenção dietética, como supracitado.

Tabela 6. Propriedades biomecânicas dos fêmures de ratas (n=8/grupo), após período de 90 dias, alimentadas com dieta controle (grupo C) ou com dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY).

	Variável	Grupo experimental		P*
		C	PBY	
Propriedades biomecânicas da diáfise femural	Força Máxima (N)	503,30 ± 137,43 ^a	494,73 ± 186,58 ^a	0,9197
	Rigidez (N.mm ⁻¹)	2193,95 ± 867,49 ^a	1556,91 ± 527,56 ^a	0,1192
	Módulo de Elasticidade (Mpa)	2432,70 ± 866,10 ^a	1869,36 ± 539,35 ^a	0,1623

* Nível de significância: 5% de probabilidade pelo *Teste t*. Valores de média ± desvio padrão seguidos de letras iguais na mesma linha, quando comparados, não diferiram estatisticamente.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a exposição de ratas a dose de 6% de FOS/Inulina de um produto a base de yacon, por um período de 90 dias direcionou para ocorrência de efeitos clínicos promissores em relação a maior produção de acetato e lactato; a menor excreção de cálcio fecal; e maior absorção aparente fracional, maior absorção aparente percentual, maior balanço mineral e maior percentual de retenção de cálcio. Estes resultados presumem impacto positivo, a longo prazo, no metabolismo ósseo de ratas “intactas”.

REFERÊNCIAS

- Association Official Analytical Chemists – AOAC. Official Methods of Analysis. Gaithersburg; 16th ed., 1997.
- Bongers A, van den Heuvel E G H M. Prebiotics and the bioavailability of minerals and trace elements. *Food Rev. Int.* 2003, 19: 397–422.
- Cashman KD. Diet, nutrition and bone health. *Journal of Nutrition.* 2007; 137: 2507S-2512S.
- Costa, NMBC. Minerais. In: Costa NMBC, Pelúzio MCG. *Nutrição Básica e Metabolismo*. Viçosa: Editora UFV, 2008, 1^a ed. 263-359.
- Fernandes BB. Influência de diferentes tipos de exercício sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras. *Dissertação [Mestrado]*. Universidade Federal de Viçosa; 2010. 57p.

Franco FSC. Efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbio associados à adequação ou não de cálcio alimentar na composição corporal, no tecido ósseo e no balanço de cálcio em ratas. Tese [Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa; 2009. 206p.

Geyer M, Manrique I, Degen L, Beglinger C. Effect of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Colonic Transit Time in Healthy Volunteers. *Digestion*. 2008; 78: 30-33.

Genta S, Cabrera W, Habiba N, Ponsb J, Carillo IM, Graud A, Sánchez S. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition*. 2009; 28: 182-187.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995; 125: 1401-1412.

Guigoz Y, Rochat F, Carrier-Perruisseau G, Rochat I, Schiffrin EJ. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutrition Research*. 2002; 22: 13-25.

Junior GIO. Influência do resíduo fibroso da moagem de milho micropulverizado a biodisponibilidade de ferro. [Dissertação Mestrado]. Universidade Federal de Viçosa; 2009.

Legette LL, Lee W, Martin BR, Story JA, Campbell JK, Weaver CM. Prebiotics enhance magnesium absorption and inulin-based fibers exert chronic effects on calcium utilization in a postmenopausal rodent model. *J Food Sci*. 2012; 77(4):H88-94.

Lobo AR, Colli C, Filisetti TMCC. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research* 2006; 26:413-420.

Lobo AR, Colli C, Alvares EP, Filisetti TMCC. 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* 2007; 97:776–785.

Lobo AR, Cocato ML, Jorgetti V, Sá LRM, Nakano EY, Colli C. Changes in bone mass, biomechanical properties and microarchitecture of calcium- and iron-deficient rats fed diets supplemented with inulin-type fructans. *Nutrition Research* 2009; 29:873- 881.

Mezadri TJ, Tomaz VA, Amaral VLL. Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis, Editora: UFSC, 2004. 155p.

Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology*. 2011; 22: 40-46.

Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L. Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 5278-5284.

Reeves P, Nielsen F, Fahey G. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN - 76 A Rodent Diet. *Journal of Nutrition* 1993; 123:1939–1951.

Roberfroid M, Gibson GR, Delzenne N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutr Rev* 1993; 51: 137-146.

Rodrigues FC, Castro ASB, Rodrigues VC, Fernandes SA, Fontes EAF, Oliveira TT, Martino HSD, Ferreira CLLF. Yacon Flour and *Bifidobacterium longum* Modulate Bone Health in Rats. *J Med Food* 2012; 15(7): 664–670.

Sant'Anna MSL, Ybarra LM, Paula HAA, Costa NMB, Ferreira CLLF. Probióticos e Prebióticos na absorção de minerais. In: Ferreira, CLL (editora). *Prebióticos e Probióticos – atualização e prospecção*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

Saulnier DMA, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009; 20: 135–141.

Scholz-Ahrens KE, Açil Y, Schrezenmeir J. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *British Journal of Nutrition* 2002; 88:365–377.

Silva JD. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2 ed., Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1990, 165 p.

Smirick-Tjardes MR, Grieshop CM, Flickinger EA. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentive characteristics of growing pigs. *American Society of Animal Science* 2003, 81:2535-45.

Statistical Analysis System – SAS. *User's procedures guide*. Version 9.1. Cary: SAS Institute, Inc 1989. 2v.

Teshima E. Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probiótico, prebiótico e simbiótico. [Tese Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa; 2001. 113p.

Zerbini C, Souza ACA. Histofisiologia Óssea. Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica. Curso Oficial de Habilitação em Densitometria, versão 2.2; 2001.

5.3. ARTIGO: – Experimento – Fases 2 e 3

Produto à base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) modula biomarcadores do metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas?

RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa fonte de inulina e fruto-oligossacarídeos-FOS, compostos bioativos prebióticos, com efeitos favoráveis associados ao aumento da absorção de alguns minerais como cálcio. Isto ocorre devido a diminuição do pH e consequente solubilização de sais complexados. Objetivou-se avaliar o potencial modulador de um produto a base de yacon-PBY em biomarcadores do metabolismo ósseo em um modelo artificial de animais com osteopenia. Foram submetidas a cirurgia de ovariectomia (OVX n=32) e celiotomia (n=32) 64 ratas da raça *Wistar*, com 120 semanas de vida. Metade dos animais recebeu dieta padrão (grupo controle) e a outra metade, dieta contendo a dose de 6,0% de FOS/inulina do PBY. Avaliou-se de acordo com protocolos padronizados: o peso relativo do ceco (PRC); a concentração de ácidos orgânicos; a absorção, o balanço e a retenção de cálcio; os níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) e telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTx) e propriedades biomecânicas do fêmur. Considerou-se um nível de significância de 5% para todas as análises estatísticas, realizadas no software SAS®. O PRC e as concentrações de acetato e lactato foram maiores no grupo que recebeu PBY. A excreção de cálcio fecal no grupo de ratas ovariectomizadas (OVX) que recebeu o PBY foi menor comparado ao grupo OVX que recebeu dieta controle ($P<0,05$) assim como a excreção de cálcio urinário ($P<0,10$). De forma coerente foi observado maior absorção, balanço e retenção de cálcio no grupo que recebeu PBY na dieta ($P<0,05$). Os níveis séricos de FA foram maiores no grupo PBY comparado ao grupo controle ($P<0,05$). Para o NTx os níveis séricos foram maiores no grupo controle comparado ao grupo que recebeu a dieta com PBY ($P<0,05$). As propriedades biomecânicas tanto da cabeça do fêmur quanto da diáfise femural apresentaram valores percentuais maiores no grupo PBY, o que pressupõe efeito favorável na resistência óssea. Conclui-se que o PBY modulou favoravelmente o metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas.

Termos de indexação: Yacon. Osteopenia. Cálcio. Metabolismo Ósseo.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida é um fato evidente no mundo todo. Neste cenário, algumas doenças se tornam mais frequentes no envelhecimento incluindo a osteoporose, uma doença óssea, que afeta principalmente mulheres na pós-menopausa, época em que se acentuam os efeitos do hipoestrogenismo (Lima-Costa e Veras, 2003; WHO, 2010; Legette et al., 2012; Brasil, 2013).

O decréscimo da absorção intestinal de cálcio está entre as alterações fisiológicas resultantes do envelhecimento que é exarcebado no período pós-menopausa (Kim et al., 2004). Em estudos com animais e humanos, a deficiência de cálcio foi associada com menor formação óssea, concomitante ao incremento na reabsorção (mobilização óssea) e fragilidade óssea (Tahiri et al., 2003; Kim et al., 2004 e Lobo et al., 2007).

Assim, favorecer a biodisponibilidade de cálcio pode auxiliar mulheres na pós-menopausa a diminuir os riscos de perda óssea e conseqüentemente, ocorrência de osteoporose. A osteoporose é considerada a maior causa da redução da qualidade de vida, devido à elevada morbidade e mortalidade, além dos altos custos envolvidos no seu tratamento (Pereira, 2008; Won et al., 2011; Sant'Anna et al., 2012).

Entre os compostos alimentares capazes de otimizar a absorção de cálcio tem-se os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, que são oligo e polissacarídeos prebióticos, respectivamente, em que predominam ligações glicosídicas do tipo frutossil-frutose $\beta(2-1)$, as quais conferem a estes compostos suas exclusivas propriedades estruturais e fisiológicas (Niness, 1999; Kelly, 2009; Yıldız, 2011). O homem e os ratos não possuem enzimas capazes de clivar essas ligações (Roberfroid, 2005) e após consumo, FOS e inulina são seletivamente fermentados no cólon por um grupo de bactérias benéficas, as quais (especialmente os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) melhoram a função gastrointestinal (Pedreschi et al., 2003), gerando ácidos orgânicos como lactato e outros ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico (Gibson e Roberfroid, 1995; Flamm et al., 2001; Geyer et al., 2008), que atuam melhorando a biodisponibilidade de cálcio.

As evidências científicas têm direcionado que essa categoria de prebióticos apresenta importante implicação na saúde (Coxam, 2005;

Roberfroid, 2005), e por isso tem sido os mais intensivamente estudados pelas propriedades de atuar benéficamente na absorção de minerais (Scholz-Ahrens et al., 2007; Legette et al., 2012; Rodrigues et al., 2012) e de melhorar estrutura óssea (Lobo et al., 2006; Cashman, 2007; Lobo et al., 2007 e Saulnier et al., 2009) além da potencial capacidade de atenuar a reabsorção óssea (Weaver et al., 2010; Legette et al., 2012).

Entre as fontes naturais de frutanos do tipo inulina, tem despertado cada vez mais a atenção da comunidade científica, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) que é uma raiz tuberosa de origem andina considerada, na atualidade, a maior fonte vegetal de FOS (Geyer et al., 2008; Genta et al., 2009; Ojansivu et al., 2011).

É importante considerar ainda que dependendo da matriz alimentar fica mais fácil ou mais difícil veicular as concentrações funcionais para as avaliações tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos. Neste sentido reforça-se a importância do produto a base de yacon (PBY), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, que facilita o consumo humano e animal e favorece a execução de estudos para definir mecanismos como o consumo de doses funcionais.

O processo passivo de absorção do cálcio pode ser suscetível à modulação por substratos fermentáveis, como os frutanos FOS/inulina. Dessa forma, estes compostos podem auxiliar na homeostase de cálcio, deslocando o principal sítio de absorção desse mineral para o intestino grosso (Coxam, 2005) em condições específicas, quando o transporte ativo de cálcio está comprometido.

Embora a posição quadrúpede do rato difere da posição bípede de humano, as semelhanças da arquitetura da vértebra e fêmur entre eles sugerem que ratos podem ser utilizados na caracterização das alterações ósseas associadas à idade, fatores hormonais e efeitos terapêuticos (Lin et al., 2003).

Assim o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito prebiótico do PBY na modulação de indicadores da saúde óssea de ratas adultas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produto à base de yacon - PBY

O produto à base de yacon testado foi desenvolvido no Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA/UFV, no entanto a descrição do seu desenvolvimento deve ser resguardada devido as exigências da solicitação de patente (INPI: 014110002964).

As análises dos teores de carboidratos não digeríveis, inulina e FOS do produto desenvolvido foram realizadas no CERAT – Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu-SP.

As concentrações de FOS e inulina foram mensuradas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme metodologia de Kaneko et al. (1990), com uma coluna BIO-RAD HPX 87P (fase estacionária de chumbo), utilizando água purificada como fase móvel. As amostras foram diluídas (1 g em 100 mL de água destilada), centrifugadas a $11.269 \times g$, e, em seguida, filtradas através de uma membrana de decafluoreto (PVDF) da polivinil Millipore com 0,22 μm de porosidade e 13 mm de diâmetro. As amostras foram então injetadas em cromatógrafo de alta eficiência (HPLC) (Varian, ProStar 410 HPLC Auto Sampler; Varian Inc, USA) com detector de índice de refração e injetor automático, com as seguintes condições de operação: taxa de fluxo de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura de coluna 85°C .

Nos grupos que receberam a intervenção com dieta teste foram utilizados a dose de 6,0% de FOS/inulina do produto à base de yacon (PBY), dose esta que foi escolhida após direcionamento obtido por meio do experimento previamente realizado.

2.2. Animais experimentais

Foram utilizadas 64 ratas (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da raça *Wistar*, recém-desmamadas (30 dias de idade) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$) e luz controladas, em fotoperíodo de 12 horas e receberam água deionizada *ad libitum*.

2.3. Cirurgia de Ovariectomia ou Celiotomia

Ao atingir 120 semanas de vida (Cheng et al., 2011; Zhang et al., 2012) metade dos animais foi submetida a cirurgia de ovariectomia (OVX), com incisão abdominal para retirada dos ovários, e a outra metade à cirurgia de celiotomia (SHAM), com incisão do abdômen para induzir o estresse cirúrgico e seus efeitos, porém sem a retirada dos ovários.

Houve suspensão dos tratamentos “*Wash out*” de quatro semanas para recuperação. Em sequência, durante 60 dias administrou-se a dieta AIN-93M (Reeves et al., 1993) (dieta controle) e acrescida da dose de 6% de FOS/Inulina do PBY (dieta PBY).

Os animais foram alocados em 4 grupos (n=16), por DIC em arranjo fatorial 2² para os dois fatores cirurgia e dieta, em dois níveis: Cirurgia (com e sem ovário), Dieta (com e sem produto a base de yacon).

2.4. Determinação do Balanço de Cálcio

Foi avaliado o balanço de cálcio (Balanço= Cálcio ingerido – Cálcio Fecal – Cálcio Urinário) e as percentagens de retenção (% Retenção = Balanço/Cálcio ingerido) e de absorção de Cálcio (% Absorção= Cálcio ingerido – Cálcio Fecal/Cálcio ingerido) (Costa, 2008).

Foram fornecidos, em média 22 g de dieta por dia e ao final de 24 horas, as sobras foram pesadas nos comedouros. Foi calculada a média diária de dieta consumida pelos animais para ser utilizada no cálculo do balanço de cálcio. Uma dieta adicionada de carmim foi oferecida com o objetivo de marcar as fezes com coloração de azul escuro, facilitando identificar as fezes provenientes da dieta do dia de análise. No primeiro dia do período delimitado para realização do balanço, foi colocada dieta marcada com carmim. Nos dois dias seguintes foram oferecidas as dietas sem marcação e, no quarto dia retornou-se com a dieta marcada com carmim (Lobo, 2007; Franco, 2009).

O conteúdo de cálcio ingerido foi determinado pela média da quantidade de dieta consumida pelos animais no período de avaliação (quatro dias) considerando o teor desse mineral presente na dieta (0,5%) (Franco, 2009; Junior, 2009).

As fezes foram coletadas em quatro dias. No segundo dia foram coletadas as fezes marcadas com carmim e, no quinto dia foram coletadas as fezes não

marcadas. O conteúdo total de fezes foi quantificado e dividido por quatro para se obter a média diária (Franco, 2009).

As fezes foram pesadas, acondicionadas hermeticamente em sacos plásticos e armazenadas em congelador a -20°C até o momento das análises. A urina foi acondicionada em tubos eppendorfs e também armazenada em congelador a -20°C até o momento das análises (Lobo et al., 2007; Lobo et al., 2009).

O volume de urina de 24 horas foi completado para 10 mL de água deionizada e centrifugado por 15 minutos a 2865 x g. Após a centrifugação foi adicionado ácido clorídrico a 50% (20µL/mL) para a conservação da amostra (Franco, 2009).

Alíquotas das fezes e do sobrenadante da urina centrifugada foram digeridas em ácido nítrico concentrado por 16 horas e, a seguir, diluídas em água deionizada para posterior determinação de cálcio (Silva, 1990; AOAC, 1997).

2.5. Desempenho dos animais

Os pesos dos animais e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente. O ganho de peso corporal foi determinado pela diferença entre os pesos no dia da eutanásia e o do primeiro dia de experimento. Foi calculado o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) (Franco, 2009): $CEA = \text{ganho de peso (g)} / \text{consumo alimentar (g)}$.

2.6. Eutanásia dos animais

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por uma overdose de dióxido de carbono (Mezadri et al., 2004) para proceder as análises subsequentes. Para avaliação física e química dos ossos, os membros inferiores foram desarticulados e passaram por remoção completa dos tecidos moles, de forma que em sequência as tíbias e os fêmures fossem pesados, identificados e acondicionados (-20°C), até o momento das análises (Lobo et al., 2009; Fernandes, 2010). Foi feita a incisão da cavidade torácica para coleta de sangue, por punção cardíaca, para proceder às análises dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.

2.7. Análise de pH, peso do ceco e ácidos orgânicos do conteúdo cecal

As amostras de conteúdo cecal, foram coletadas em sacos plásticos estéreis de polietileno da marca Whirl-Pak (Nasco Whirl-Pak[®]; Nasco, USA) com capacidade de 100mL. Após a retirada do conteúdo cecal, foi realizada a determinação do pH em pHmetro digital, devidamente calibrado (Teshima, 2001; Guigoz et al., 2002). O ceco foi pesado e determinado o peso relativo conforme a equação: [peso relativo do ceco = peso do ceco (g) ÷ peso corporal final (g)].

Para determinação dos ácidos orgânicos: ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta - AGCC (ácido acético, propiônico e butírico) foi utilizado método descrito por Smiricky-Tjardes et al. (2003). As amostras do conteúdo cecal foram adicionadas de 500 µL de ácido meta-fosfórico a 25%, em tubo para microcentrifugação com posterior agitação em vortex (Velp Scientifica[®], Infrared Vortex Mixer WX; Velp Scientifica, Italy) por 30 segundos, mantidas em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Após esse período, foram centrifugadas em micro centrífuga refrigerada (Centrifuge, model 5804 R; Eppendorf do Brasil, São Paulo-SP) a $14.262 \times g$, por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para microcentrifugação sendo novamente centrifugado por 20 minutos, nas mesmas condições descritas anteriormente. Feito isso, o sobrenadante correspondente a cada amostra foi separado em frascos individuais, onde adicionou-se mais 400 µL de ácido meta-fosfórico a 25% seguindo-se congelamento a -20°C .

Após esta etapa as amostras foram analisadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em cromatógrafo SHIMADZU (SPD-10AVP, (SHIMADZU do Brasil, São Paulo-SP), acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se comprimento de onda de 210 nm; coluna C18 (fase inversa) da marca BIORAD (Bio-Rad Laboratories Brazil, Rio de Janeiro), com 30 cm x 4.5 mm de diâmetro, fluxo na coluna de 0,6 mL/minuto (AGCC) e de 0,4 mL/minuto (ácido láctico), pressão na coluna de 123 Kgf/cm² (AGCC) e de 102 Kgf/cm² (ácido láctico); fase móvel: água em 1% de Ácido Orto Fosfórico e volume injetado de 20 µL.

2.8. Determinação do Conteúdo Mineral Ósseo

As tíbias foram colocadas em tubos de ensaio individuais, específicos para a digestão de minerais. As análises de cálcio, magnésio e fósforo foram realizadas pelo método de digestão ácida, em bloco digestor, com 10 mL dos ácidos nítrico (HNO_3) e perclórico (HClO_4) na proporção 3:1. Para a análise do conteúdo mineral dos ossos adicionou-se a solução ácida, previamente mencionada, e os tubos foram mantidos em capela de exaustão de gases por aproximadamente 6 horas até que as tíbias estivessem totalmente dissolvidas (sem identificar fragmentos ósseos) (Franco, 2008; Rodrigues, 2012).

Os tubos de ensaios foram aquecidos por 16 horas no bloco digestor a uma temperatura variando entre 80 e 160°C. A cada 20 minutos a temperatura foi elevada progressivamente em 20°C até alcançar 160°C. Após as primeiras 8 horas de digestão, foram adicionados 5 mL de solução ácida ($3\text{HNO}_3 + 1\text{HClO}_4$) para evitar que a solução secasse. Ao final da digestão, os tubos permaneceram na capela de exaustão, resfriando a temperatura ambiente. Após esta etapa, o conteúdo do tubo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água deionizada. Deste balão volumétrico retirou-se uma alíquota para a leitura dos minerais.

Posteriormente, para as análises de cálcio e magnésio, ao material digerido foi adicionado 5 mL (10%) de solução de cloreto de estrôncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Foi analisado o conteúdo de cálcio, nas dietas depois de preparadas e no produto à base de yacon. O cálcio foi ainda determinado na urina e nas fezes diluídos e na tíbia inteira diluído.

Todo o material utilizado (vidraria, recipientes de plástico), para a análise dos minerais mencionados, foi submetido previamente a lavagem em água corrente e detergente neutro, imersão por 24 horas com detergente seguida de enxágue com água deionizada, imersão em solução de ácido nítrico (HNO_3) a 10% por 24 horas, seguido de enxágue com água deionizada, e secagem em estufa. Todas as etapas de enxágue foram realizadas em série de três repetições (Franco, 2009).

Os minerais (cálcio, magnésio e fósforo) foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Varian - Agilente, SpectrAA 220FS - Fast Sequencial, Austrália), do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa/UFV.

2.9. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

As análises dos biomarcadores ósseos de formação (Fosfatase Alcalina) e reabsorção (Telopectídeo Aminoterminal do Colágeno tipo I) foram realizadas utilizando Kits comerciais. Todos os procedimentos foram realizados conforme preconizado no manual técnico do fabricante.

Para análise da Fosfatase Alcalina foi utilizado o Kit da marca Bioclin. As amostras foram hidratadas com 200 µL de NaCl 0,9%, sendo feita a leitura em aparelho analisador multiparamétrico para análises bioquímicas (Alizé B.652; Lisabio, France).

Os níveis séricos de Telopectídeos Aminoterminais do colágeno tipo I (NTx) foram avaliados por meio de ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) da marca USCNK – Life Science Inc. A leitura da placa foi realizada em equipamento leitor de microplaca (Versa max, microplate reader).

2.10. Densitometria Mineral Óssea

A análise da Densidade Mineral Óssea (DMO) do fêmur foi realizada em Densitômetro Ósseo de Raios-X (LUNAR DPX-ALPHA), na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), em Araçatuba, SP.

2.11. Análise Física – Propriedades Biomecânicas

A análise da resistência óssea foi realizada no mesmo fêmur, logo após a análise da DMO (Fernandes, 2010). O osso foi submetido a ensaio mecânico em máquina universal de ensaio (EMIC®, modelo DL 3000), do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia da UNESP, Araçatuba-SP, com carga aplicada a uma velocidade de 5mm/min. Um sistema computadorizado acoplado ao aparelho registra a força (carga) e o deslocamento, permitindo obter o valor da força referente a cada deslocamento. A aquisição destes pontos foi realizada em intervalos padronizados de tempo definidos pelo programa. A análise foi realizada tanto no colo do fêmur (com predomínio do osso esponjoso) como também no terço médio da diáfise (com predomínio do osso cortical).

Foi realizado ensaio de flexão na cabeça do fêmur, com a amostra fixada em um aparato mecânico ficando em posição vertical. A cada incremento de carga aplicada ao material o computador automaticamente registrou a deformação correspondente, para, depois ser construído o gráfico carga *versus* deformação, a partir do qual pode-se obter: força máxima (maior força aplicada à amostra) e rigidez (dada pela inclinação da curva na fase elástica). Também foi avaliada a tenacidade das amostras, que corresponde à energia absorvida pelo corpo, obtida pelo cálculo da área sob a curva carga *versus* deformação até o ponto de ruptura da amostra.

Na diáfise femural, para melhor simular efeito da força de compressão exercido pelo corpo, foi utilizado um bloco obtido dessa região do fêmur, procedendo-se da seguinte maneira: foi utilizado uma estrutura metálica e borracha, ambos de aproximadamente 5 mm de largura e 20mm de comprimento. Apertou-se a estrutura com alicate de modo que ele se fechasse. Com uma pinça Halsted (mosquito) prendeu-se o osso pela estrutura. Segurou-se a pinça e usou-se o dedo como apoio e passou-se o osso por uma serra elétrica, de ambos os lados. Com a própria pinça retirou-se o osso cortical. Em seguida obteve-se a imagem do bloco obtido e realizou-se o ensaio de flexão em aparelho Universal de Ensaio EMIC[®] acoplado a um computador, conforme supracitado.

Com as imagens dos blocos obtidos utilizou-se o programa Image J, de domínio público (<http://rbs.info.nih.gov/ij>), por meio do qual calculou-se a área para as variáveis de interesse.

2.12. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software SAS[®] (*Statistical Analysis System* – SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1989) versão 9.1 licenciado para a Universidade Federal de Viçosa. Considerou-se um nível de significância de 5% para todas as análises.

2.13. Aspectos Éticos

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa com animais da Universidade Federal de Viçosa, parecer nº 55/2011.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo constitui-se no primeiro, até então, reportado na literatura sobre o efeito prebiótico do PBY na modulação de indicadores da saúde óssea de ratas adultas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.

Observa-se que o GP e CEA foram maiores nos animais que receberam a dieta controle ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Ganho de peso corporal (GP), consumo alimentar total (CA) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratas (n=16/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBV).

Variáveis		Fatores	
		C	PBY
GP (g)	OVX	49,19 ± 26,77 ^{Aa}	21,86 ± 15,82 ^{Ab}
	SHAM	33,31 ± 13,69 ^{Aa}	20,07 ± 26,73 ^{Ab}
CA (g)	OVX	1272,67 ± 127,33 ^{Aa}	1379,55 ± 90,25 ^{Ab}
	SHAM	1254,37 ± 107,62 ^{Aa}	1346,31 ± 62,15 ^{Ab}
CEA	OVX	0,04 ± 0,02 ^{Aa}	0,02 ± 0,01 ^{Ab}
	SHAM	0,03 ± 0,01 ^{Aa}	0,01 ± 0,02 ^{Ab}

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média ± desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P > 0,05$).

Já o consumo alimentar total (CA) foi maior nos animais que receberam a dieta com PBY ($P < 0,05$) independente das ratas serem OVX (sem ovários) ou SHAM (com ovários) (Tabela 1).

A osteopenia induzida pela ovariectomia promoveu maior ganho de peso corporal, por elevar a deposição de gordura corporal (Franco, 2009). Apesar de sem significância estatística, mas em termos clínicos interessa notar que o grupo OVX (sem ovários) apresentou maior peso corporal em relação ao grupo SHAM (com ovários) (para os dois tipos de dieta). Nos animais que receberam dieta contendo PBY observou-se que as OVX ganharam 8,2% a mais de peso que as SHAM. Nos animais que receberam dieta controle verificou-se que nas OVX o ganho ponderal foi 33% a mais que nas SHAM. Percebe-se que os animais que receberam dieta acrescida de PBY tiveram menor ganho de peso que as ratas do grupo controle, independente do tipo de cirurgia a que foram submetidas.

O peso relativo do ceco foi maior nos animais que receberam a dieta com PBY independente das ratas serem OVX (sem ovário) ou SHAM (com ovário) ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Peso relativo do ceco (PRC), pH cecal e concentração de ácidos orgânicos do conteúdo cecal de ratas ($n=16$ /grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY).

Variáveis	Fatores		
		C	PBY
PRC	OVX	$0,0037 \pm 0,0005^{Aa}$	$0,0043 \pm 0,0008^{Ab}$
	SHAM	$0,0036 \pm 0,0009^{Aa}$	$0,0037 \pm 0,0004^{Ab}$
pH cecal	OVX	$6,80 \pm 0,21^{Aa}$	$6,85 \pm 0,23^{Aa}$
	SHAM	$6,66 \pm 0,47^{Aa}$	$6,77 \pm 0,22^{Aa}$
Acetato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	OVX	$26,62 \pm 11,56^{Aa}$	$31,36 \pm 13,48^{Ab}$
	SHAM	$23,69 \pm 13,35^{Aa}$	$33,60 \pm 17,64^{Ab}$
Butirato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	OVX	$23,53 \pm 9,52^{Aa}$	$26,80 \pm 12,62^{Aa}$
	SHAM	$21,10 \pm 14,35^{Aa}$	$29,30 \pm 16,17^{Aa}$
Propionato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	OVX	$11,56 \pm 6,34^{Aa}$	$12,77 \pm 5,66^{Aa}$
	SHAM	$9,82 \pm 6,38^{Aa}$	$14,85 \pm 11,12^{Aa}$
Lactato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	OVX	$1,21 \pm 0,54^{Aa}$	$2,00 \pm 0,92^{Ab}$
	SHAM	$1,22 \pm 0,49^{Aa}$	$2,14 \pm 1,13^{Ab}$

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média \pm desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P > 0,05$).

No grupo que recebeu dieta contendo PBY o peso relativo do ceco foi maior, independente das ratas estarem ovariectomizadas ou não. Isto evidencia o efeito osmótico dos prebióticos FOS/Inulina presentes no produto testado. Este

efeito osmótico atua como um mecanismo estimulador do transporte paracelular de minerais, por aumentar a solubilização mineral em um volume maior de líquido no intestino grosso (Bongers et al., 2003; Weaver et al., 2010).

O pH não apresentou diferença entre os grupos controle e PBY submetidos a ovariectomia ou SHAM ($P > 0,05$). Já em relação aos ácidos graxos de cadeia curta o acetato foi maior nos animais que receberam a dieta com PBY ($P < 0,05$) e para os demais AGCC: propionato e butirato não houve diferença entre grupos. Já o ácido orgânico lactato foi maior nos animais que receberam a dieta com PBY ($P < 0,05$) (Tabela 2), independente do tipo de cirurgia (com retirada dos ovários – OVX ou sem a retirada dos ovários – SHAM).

No grupo PBY a maior concentração de acetato (15,11%) e lactato (39,50%) nas ratas sem ovário (OVX) indica o efeito prebiótico do PBY por alterar a microbiota intestinal favorecendo a atividade de bactérias bífidas. Este fato é uma via regulatória importante para a biodisponibilidade do cálcio, ingerido na dieta. A presença dos ácidos orgânicos desencadeia a redução do pH do conteúdo luminal e solubiliza o cálcio insolúvel presente como fosfato e carbonato. O conteúdo de cálcio luminal é aumentado e conseqüentemente sua absorção (Ohta et al., 1998; Kruger et al., 2003).

Outro mecanismo proposto para o efeito de carboidratos fermentáveis na absorção mineral é por meio do incremento da área da superfície absorptiva. Tal fato ocorre em resposta a proliferação celular colônica advinda da ação dos ácidos graxos de cadeia curta (Weaver et al., 2010).

O conteúdo de cálcio urinário foi menor ($P = 0,08$) no grupo que recebeu dieta PBY o que representou, percentualmente, 13,58% maior excreção urinária no grupo que não recebeu a dieta contendo PBY (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo de cálcio ingerido, de cálcio na urina e de cálcio nas fezes de ratas (n=16/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY).

Variáveis	Fatores		
		C	PBY
Conteúdo de cálcio ingerido (mg/dia)	OVX	108,66 ± 14,31 ^{Aa}	109,82 ± 3,59 ^{Aa}
	SHAM	106,76 ± 17,00 ^{Aa}	108,21 ± 4,93 ^{Aa}
Cálcio urinário (mg/dia)	OVX	23,96 ± 13,53 ^{Aa}	23,57 ± 9,80 ^{Aa}
	SHAM	21,78 ± 11,66 ^{Aa}	15,96 ± 8,93 ^{Aa}
Cálcio fecal (mg/dia)	OVX	28,38 ± 5,58 ^{Aa}	22,16 ± 7,26 ^{Ab}
	SHAM	27,52 ± 8,49 ^{Aa}	21,81 ± 7,24 ^{Ab}

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média ± desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P>0,05$).

Ressalta-se também que as ratas OVX (sem ovários) que receberam a dieta controle apresentaram 9,09% maior excreção de cálcio na urina quando comparadas as ratas SHAM (com ovários) que também receberam a dieta controle. Segundo Gala et al. (2001), um aumento de cálcio urinário na menopausa é um dos fatores que contribui para o desenvolvimento da osteopenia.

Já o cálcio excretado nas fezes foi maior (21,34%) nos animais que receberam a dieta controle ($P<0,05$) (Tabela 3). A excreção de cálcio fecal no grupo de ratas ovariectomizadas (sem ovários) que recebeu o PBY foi menor ($22,16 \pm 7,26$) comparado ao grupo OVX que recebeu dieta controle ($28,38 \pm 5,58$) ($P<0,05$). A menor perda de cálcio nas fezes do grupo que recebeu a dieta contendo PBY sugere uma maior oferta de cálcio corporal. Contrastando esta observação, de acordo com Zhang et al. (2006), a ausência de estrogênio estimula a menor liberação de vitamina D, reduzindo a absorção intestinal de cálcio e promovendo um balanço de cálcio negativo e por consequência menor retenção de cálcio nos ossos.

A absorção aparente fracional, a absorção aparente percentual, o balanço mineral e percentual de retenção de cálcio foram maiores no grupo que recebeu a dieta PBY ($P < 0,05$). (Tabela 4)

Tabela 4. Absorção aparente fracional, balanço mineral de cálcio e % retenção mineral de ratas ($n=16$ /grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY).

Variáveis		Fatores	
		C	PBY
Absorção aparente fracional (mg/dia)	OVX	80,23 ± 17,13 ^{Aa}	87,65 ± 7,51 ^{Ab}
	SHAM	79,24 ± 20,17 ^{Aa}	86,40 ± 6,82 ^{Ab}
Absorção aparente (%)	OVX	73,22 ± 7,52 ^{Aa}	79,83 ± 6,52 ^{Ab}
	SHAM	73,33 ± 9,80 ^{Aa}	79,92 ± 6,38 ^{Ab}
Balanço mineral de cálcio (mg/dia)	OVX	56,32 ± 14,49 ^{Aa}	64,07 ± 11,44 ^{Ab}
	SHAM	57,46 ± 21,13 ^{Aa}	70,44 ± 10,13 ^{Ab}
% Retenção mineral	OVX	51,52 ± 10,11 ^{Aa}	58,39 ± 10,48 ^{Ab}
	SHAM	53,15 ± 15,04 ^{Aa}	65,21 ± 9,62 ^{Ab}

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média ± desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P > 0,05$).

Absorção aparente fracional: Conteúdo de cálcio ingerido (mg) - conteúdo de cálcio excretado nas fezes (mg);

Absorção aparente %: [Conteúdo de cálcio ingerido (mg) - conteúdo de cálcio excretado nas fezes (mg)/ Conteúdo de cálcio ingerido (mg)] x 100;

Balanço mineral de cálcio: [Conteúdo de cálcio ingerido (mg) - (conteúdo de cálcio excretado nas fezes (mg) + conteúdo de cálcio excretado na urina (mg))];

% Retenção mineral: [Balanço mineral de cálcio/Conteúdo de cálcio ingerido (mg)] x 100.

No grupo OVX (sem ovário) que recebeu a dieta PBY a absorção aparente fracional, a absorção aparente percentual, o balanço mineral de cálcio e a retenção deste mineral apresentaram-se 8,46%, 8,28%, 12,09% e 11,76%, nessa ordem, maiores quando comparado as ratas OVX do grupo que recebeu dieta controle. Pode-se inferir que o PBY modulou favoravelmente o metabolismo de cálcio nas ratas ovariectomizadas.

A análise estatística indicou que independente do tipo de cirurgia (sem ovário – OVX ou com manutenção dos ovários – SHAM) a diferença nos valores médios das variáveis relacionadas ao balanço de cálcio, supracitadas, foi devido ao tipo de dieta administrada aos animais.

De acordo com Weaver et al. (2010) discrepâncias entre conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea e entre absorção de cálcio e balanço de cálcio podem estar relacionados a efeitos de adaptação bem como as diferentes sensibilidades dos ensaios biológicos. Parâmetros ósseos poderiam refletir efeitos iniciais da intervenção dietética. De forma a serem detectados num período inicial do estudo, e não em um ponto de tempo posterior. Já a retenção mineral e balanço mineral refletiriam efeitos tardios observados no final do estudo.

A adaptação ocorre com o transporte ativo por meio da proteína transportadora de cálcio e dependente de vitamina D. A regulação do transporte ativo se dá em resposta de mais cálcio sendo transportado, pelo epitélio intestinal, na presença de fatores que melhoram o processo absorptivo (Weaver et al., 2010).

A retenção dos minerais: cálcio, magnésio, fósforo nas tíbias não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Conteúdo Mineral nas tíbias de ratas (n=16/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY).

Variáveis	Fatores		
		C	PBY
Cálcio (%)	OVX	22,04 ± 4,06 ^{Aa}	23,12 ± 6,94 ^{Aa}
	SHAM	22,59 ± 6,55 ^{Aa}	23,50 ± 3,05 ^{Aa}
Fósforo (%)	OVX	9,16 ± 1,27 ^{Aa}	8,54 ± 2,76 ^{Aa}
	SHAM	9,14 ± 2,36 ^{Aa}	9,39 ± 0,77 ^{Aa}
Magnésio (%)	OVX	0,20 ± 0,01 ^{Aa}	0,21 ± 0,06 ^{Aa}
	SHAM	0,21 ± 0,05 ^{Aa}	0,21 ± 0,01 ^{Aa}

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média ± desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P > 0,05$).

É provável que o período de intervenção com a dieta contendo PBY, pós cirurgias, possa ter influenciado nestas variáveis. Possivelmente um período experimental superior a 60 dias poderia detectar valores maiores e significativos de retenção de minerais nas tíbias dos animais que receberam a dieta com PBY.

O *turnover* ósseo foi estimado pelo marcador de formação óssea (Figura 1) e de reabsorção óssea NTx (Figura 2).

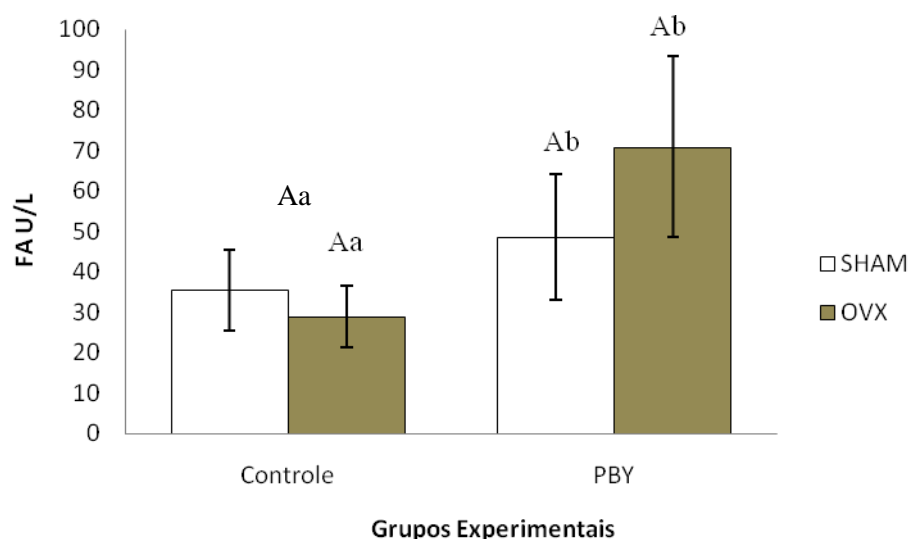


Figura 1. Conteúdo sérico de Fosfatase Alcalina (FA) de ratas (n=10/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY). OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Controle (Dieta Controle); PBY (dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon). Valores de média \pm desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula entre dietas e maiúscula entre cirurgias, quando comparados, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P > 0,05$).

Verificou-se que os níveis séricos de Fosfatase Alcalina foram maiores ($P < 0,05$) no grupo que recebeu a dieta PBY (SHAM= $48,55 \pm 15,58$ e OVX= $70,9 \pm 22,44$) comparado ao grupo controle (SHAM= $35,50 \pm 10,00$ e OVX= $28,90 \pm 7,56$) não sendo observado diferença significativa entre as ratas OVX (sem ovários) e SHAM (com ovários). Contudo, numericamente no grupo PBY as ratas OVX apresentaram maiores níveis de FA (59,23%) comparadas as ratas OVX do grupo que recebeu dieta controle.

A Fosfatase Alcalina é um marcador de formação óssea. Verificou-se que os níveis séricos foram significativamente maiores no grupo que recebeu a dieta PBY tanto para os animais SHAM quanto para os OVX. Estes níveis foram expressivamente aumentados nas ratas OVX alimentadas com PBY, o que poderia se justificar pelo processo de regeneração maior nestes animais, em decorrência de um mecanismo regulatório do organismo.

Para o NTx os níveis séricos foram maiores ($P < 0,05$) no grupo controle (SHAM= $38,29 \pm 12,69$ e OVX= $48,97 \pm 17,41$), comparados ao grupo que recebeu a dieta com PBY (SHAM= $30,56 \pm 10,86$ e OVX= $36,06 \pm 13,13$) (Figura 2).

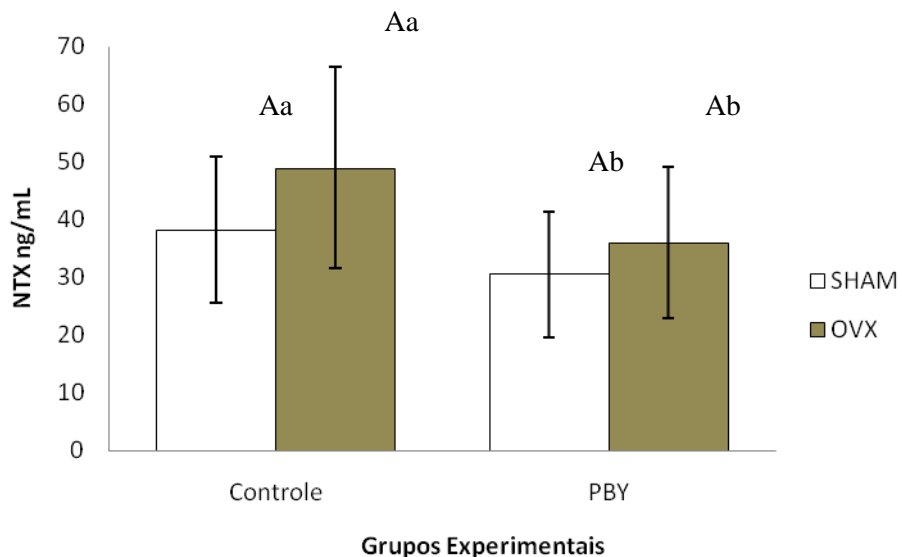


Figura 2. Conteúdo sérico de telopeptídeo N-terminal do colágeno tipo I (NTx I) de ratas (n=10/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY). OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Controle (Dieta Controle); PBY (dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon). Valores de média \pm desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula entre dietas e maiúscula entre cirurgias, quando comparados, não diferem entre si pelo teste de Fisher ($P>0,05$).

Observou-se que em relação a cirurgia (OVX – sem ovários ou SHAM – com ovários), o NTx não diferiu estatisticamente em cada um dos grupos avaliados (Controle e PBY). Porém, foi 26,36% menor nos animais ovariectomizados (sem ovários) que receberam a dieta PBY em relação aos OVX que receberam dieta controle. Aspecto este positivo, visto que principalmente considerando o grupo OVX o processo de reabsorção óssea está maior em virtude do hipostrogenismo. É possível que a presença de FOS/Inulina do PBY tenha contribuído na melhor regulação do remodelamento ósseo atenuando o efeito de perda óssea. As ratas SHAM (com ovários) que receberam dieta com PBY apresentaram menores valores de NTx (20,19%) quando comparados com o grupo SHAM que recebeu dieta controle.

De acordo com Zafar et al. (2004) o maior efeito dos frutanos FOS/inulina no metabolismo de cálcio em ratas OVX (sem ovários) seria suprimindo a reabsorção óssea.

A DMO e o conteúdo mineral ósseo (CMO) dos fêmures das ratas ovariectomizadas e SHAM não diferiram estatisticamente e nem variaram em relação ao tipo de dieta ($P>0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Densitometria mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) dos fêmures de ratas (n=16/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY).

Variáveis	Fatores		
	C	PBY	
DMO (g/cm ²)	OVX	0,21 ± 0,03 ^{Aa}	0,21 ± 0,03 ^{Aa}
	SHAM	0,23 ± 0,03 ^{Aa}	0,22 ± 0,04 ^{Aa}
CMO (g)	OVX	0,31 ± 0,05 ^{Aa}	0,32 ± 0,06 ^{Aa}
	SHAM	0,32 ± 0,05 ^{Aa}	0,30 ± 0,06 ^{Aa}

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média ± desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher (P>0,05).

No presente estudo o período pós-ovariectomia com intervenção dietética com PBY foi de 60 dias. Francisco et al. (2011) mencionam que o tempo pós-OVX pode explicar as discrepâncias reportadas na literatura em relação ao impacto no tecido ósseo. Jiang et al. (2008) descreveram que o processo de ovariectomia não modulou a densidade mineral ou rigidez óssea em ratas, conforme observado neste estudo.

As propriedades biomecânicas da cabeça do fêmur: força máxima, rigidez e tenacidade também não variaram em relação aos tipos de cirurgias e de dietas (P>0,05) (Tabela 7).

Tabela 7. Propriedades biomecânicas dos fêmures (região da cabeça) de ratas (n=16/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY).

Variáveis	Fatores		
		C	PBY
Força Máxima (N)	OVX	116,09 ± 30,88 ^{Aa}	125,58 ± 14,64 ^{Aa}
	SHAM	129,89 ± 31,54 ^{Aa}	125,08 ± 26,67 ^{Aa}
Rigidez (N.mm ⁻¹)	OVX	195,29 ± 90,61 ^{Aa}	241,65 ± 65,86 ^{Aa}
	SHAM	265,74 ± 91,19 ^{Aa}	238,26 ± 49,16 ^{Aa}
Tenacidade (MJ)	OVX	60,81 ± 22,46 ^{Aa}	68,06 ± 27,88 ^{Aa}
	SHAM	55,87 ± 26,07 ^{Aa}	55,61 ± 20,08 ^{Aa}

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média ± desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher (P>0,05).

Entretanto, a força máxima, a rigidez e a tenacidade foram 8,17%, 23,73% e 11,92% maiores nos animais ovariectomizados (sem ovários) do grupo PBY comparados aos ovariectomizados do grupo que recebeu dieta controle. Presume-se que tais percentuais, são expressivos em termos clínicos e podem predizer melhor saúde óssea.

A mesma tendência (maiores valores percentuais) para as propriedades biomecânicas da diáfise do fêmur foram observadas no grupo que recebeu dieta com PBY (Tabela 8).

Tabela 8. Propriedades biomecânicas dos fêmures (região da diáfise) de ratas (n=16/grupo), após período de 60 dias, para os fatores cirurgia (com e sem ovário) e dieta (com e sem PBY).

Variáveis	Fatores		
		C	PBY
Força Máxima (N)	OVX	559,31 ± 212,02 ^{Aa}	632,01 ± 148,41 ^{Aa}
	SHAM	642,19 ± 174,03 ^{Aa}	602,00 ± 153,83 ^{Aa}
Rigidez (N.mm ⁻¹)	OVX	2227,33 ± 1335,61 ^{Aa}	2283,75 ± 1007,25 ^{Aa}
	SHAM	2271,35 ± 1116,94 ^{Aa}	2202,31 ± 956,95 ^{Aa}
Módulo de Elasticidade (Mpa)	OVX	2454,57 ± 1383,47 ^{Aa}	2642,61 ± 1254,51 ^{Aa}
	SHAM	2562,08 ± 1087,68 ^{Aa}	2674,94 ± 1268,29 ^{Aa}

OVX: Ratas ovariectomizadas; SHAM: Ratas não ovariectomizadas mas submetidas ao estresse cirúrgico; Dieta controle (grupo C); dieta contendo 6% de FOS/inulina do produto à base de yacon (grupo PBY). Valores de média ± desvio padrão seguidos de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, quando comparados para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Fisher (P>0,05).

A força máxima, a rigidez e o módulo de elasticidade da diáfise femural apresentaram diferença numérica maior (12%), (2,5%) e (7,0%), respectivamente, no grupo OVX (sem ovários) que recebeu dieta contendo PBY. Tal resultado condiz com o objetivo final dos alimentos funcionais em relação a saúde óssea que é aumentar a resistência à fratura (Weaver et al., 2010).

Cerca de 80 a 90% do volume total do osso cortical (que predomina na região da diáfise femural) está calcificado, enquanto que, o volume de osso trabecular calcificado (que predomina na cabeça do fêmur) é da ordem dos 15 a 25%. Assim o osso cortical tem uma maior densidade e uma menor porosidade (Junqueira, 2008).

Como a resistência de um osso às forças de compressão é proporcional ao quadrado da sua densidade, o módulo de elasticidade e, conseqüentemente, a resistência mecânica do osso cortical pode atingir 10 vezes a do osso esponjoso (Junqueira, 2008).

3. CONCLUSÃO

O grupo de ratas que recebeu o produto a base de yacon na dieta apresentou maior peso relativo do ceco e maior concentração de acetato e lactato no conteúdo cecal.

Em termos clínicos observou-se que a dieta com PBY diminuiu nas ratas OVX (sem ovários) e SHAM (com ovários) os níveis de excreção de cálcio nas fezes e urina com impacto positivo e significativo na absorção e retenção de cálcio corporal.

Os níveis séricos de FA foram maiores no grupo PBY comparado ao grupo controle, não sendo observada diferença significativa entre as ratas OVX e SHAM. As ratas OVX alimentadas com PBY apresentaram maiores níveis de fosfatase alcalina.

No grupo PBY os níveis séricos do marcador de reabsorção óssea NTx, que normalmente mostram-se elevados na deficiência de estrogênio, foram menores. Isso poderia indicar atenuação do processo de perda óssea nas ratas ovariectomizadas.

As propriedades biomecânicas tanto da cabeça do fêmur quanto da diáfise femural apresentaram valores percentuais maiores no grupo PBY, o que pressupõe maior resistência óssea.

Há perspectivas que o PBY possa ser uma alternativa promissora para atenuar os efeitos deletérios no metabolismo ósseo advindos da osteopenia em modelo animal. Ressalta-se que o impacto da deficiência de estrogênio (ovariectomia) combinada a uma dieta contendo produto à base de yacon (fonte de frutanos tipo inulina que potencializam a absorção de cálcio) demanda mais investigações sistemáticas mas os indícios encontrados neste estudo são positivos.

Sugere-se um período maior de exposição à osteopenia (tempo pós ovariectomia) concomitante a intervenção dietética com PBY. Sabe-se que é elevado o custo para manter os animais por um longo período experimental, mas é necessário mais tempo de intervenção para melhores elucidações.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association Official Analytical Chemists – AOAC. Official Methods of Analysis. Gaithersburg; 16th ed., 1997.

Brasil. Osteoporose: cuidados para a sua saúde. Disponível em: <http://www.osteoprotecao.com.br/os_osteobr.php>. Acesso em: 07/01/2013.

Cashman KD. Diet, nutrition and bone health. Journal of Nutrition. 2007; 137: 2507S-2512S.

Costa, NMBC. Minerais. In: Costa NMBC, Pelúzio MCG. Nutrição Básica e Metabolismo. Viçosa: Editora UFV, 2008, 1^a ed. 263-359.

Coxam V. Inulin-type fructans and bone health: state of the art and perspectives in the management of osteoporosis. Br J Nutr 2005; 93: Suppl 1:S111-23.

Fernandes BB. Influência de diferentes tipos de exercício sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras. Dissertação [Mestrado]. Universidade Federal de Viçosa; 2010. 57p.

Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L., Roberfroid M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2001; 41: 353-362.

Francisco J I, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between Age, Skeletal Site, and Time Post-Ovariectomy on Bone Mineral and Trabecular Microarchitecture in Rats. Journal Of Orthopaedic Research 2011; 189:196.

Franco FSC. Efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbio associados à adequação ou não de cálcio alimentar na composição corporal, no tecido ósseo e no balanço de cálcio em ratas. Tese [Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa; 2009. 206p.

Gala J, Díaz-Curiel M, De La Piedra C, Calero J. Short and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. Br J Nutr 2001; 86(4): 521-7.

Genta S, Cabrera W, Habiba N, Ponsb J, Carillo IM, Graud A, Sánchez S. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. Clinical Nutrition. 2009; 28: 182-187.

Geyer M, Manrique I, Degen L, Beglinger C. Effect of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Colonic Transit Time in Healthy Volunteers. Digestion. 2008; 78: 30-33.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 1995; 125: 1401-1412.

Guigoz Y, Rochat F, Carrier-Perruisseau G, Rochat I, Schiffrin EJ. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutrition Research*. 2002; 22: 13-25.

Jiang JMY, Sacco SM, Ward WE. Ovariectomy induced hiperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. *J Nutr* 2008; 138:2106-2110.

Junior GIO. Influência do resíduo fibroso da moagem de milho micropulverizado a biodisponibilidade de ferro. [Dissertação Mestrado]. Universidade Federal de Viçosa; 2009.

Junqueira LCCJ. Tecido ósseo. In: Koogan G (editor). *Histologia Básica*. 11ª edição, p.108-26.

Kelly G. Inulin-Type Prebiotics: A Review (Part 2). *Alternative Medicine Review* 2009; 14 (1): 36-55.

Kim YY, Jang KH, Lee EY, Cho Y, Kang SA, Ha WK, Choue R. The effect of chicory fructan fiber on calcium absorption and bone metabolism in korean postmenopausal women. *Nutr Sci* 2004; 7:151-7.

Kruger MC, Brown KE, Collett G, Layton L, Schollum LM. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003; 228:683–8.

Legette LL, Lee W, Martin BR, Story JA, Campbell JK, Weaver CM. Prebiotics enhance magnesium absorption and inulin-based fibers exert chronic effects on calcium utilization in a postmenopausal rodent model. *J Food Sci*. 2012; 77(4):H88-94.

Lima-Costa M, Veras R. Saúde pública e envelhecimento. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(3):700-1.

Lin F, Hasegawa M, Kodama O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2003; 67: 2154-2159.

Lobo AR, Colli C, Filisetti TMCC. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research* 2006; 26:413-420.

Lobo AR, Colli C, Alvares EP, Filisetti TMCC. 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* 2007; 97:776–785.

Lobo AR, Cocato ML, Jorgetti V, Sá LRM, Nakano EY, Colli C. Changes in bone mass, biomechanical properties and microarchitecture of calcium- and iron-deficient rats fed diets supplemented with inulin-type fructans. *Nutrition Research* 2009; 29:873- 881.

Mezadri TJ, Tomaz VA, Amaral VLL. Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis, Editora: UFSC, 2004. 155p.

Niness KR. Inulin and Oligofructose: what are they? J. Nutr. 1999; 129 (7): 1402S1406S.

Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. Trends in Food Science & Technology. 2011; 22: 40-46.

Ohta A, Motohashi K, Ohtsuki M, Hirayama M, Adachi T, Sakuma K. Dietary fructooligosaccharides change the intestinal mucosal concentration of calbindin-D9K in rats. J Nutr 1998; 128:934–9.

Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L. Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. J. Agric. Food Chem. 2003; 51: 5278-5284.

Pereira APP. Efeito da suplementação de cálcio e vitamina D no metabolismo mineral ósseo de mulheres na pós-menopausa com osteoporose. Dissertação [Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo. 2008.

Reeves P, Nielsen F, Fahey G. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN - 76 A Rodent Diet. Journal of Nutrition 1993; 123:1939–1951.

Roberfroid M, Gibson GR, Delzenne N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. Nutr Rev 1993; 51: 137-146.

Roberfroid, M.B. Introducing inulin-type fructans. British Journal of Nutrition. 2005; 93: S13–S25.

Rodrigues FC, Castro ASB, Rodrigues VC, Fernandes SA, Fontes EAF, Oliveira TT, Martino HSD, Ferreira CLLF. Yacon Flour and Bifidobacterium longum Modulate Bone Health in Rats. J Med Food 2012; 15(7): 664–670.

Saulnier DMA, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. Current Opinion in Biotechnology. 2009; 20: 135–141.

Sant'Anna MSL, Ybarra LM, Paula HAA, Costa NMB, Ferreira CLLF. Probióticos e Prebióticos na absorção de minerais. In: Ferreira, CLL (editora). Probióticos e Prebióticos – atualização e prospecção. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

Scholz-Ahrens KE, Açil Y, Schrezenmeir J. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *British Journal of Nutrition* 2002; 88:365–377.

Silva JD. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2 ed., Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1990, 165 p.

Smirick-Tjardes MR, Grieshop CM, Flickinger EA. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentive characteristics of growing pigs. *American Society of Animal Science* 2003, 81:2535-45.

Statistical Analysis System – SAS. *User's procedures guide*. Version 9.1. Cary: SAS Institute, Inc 1989. 2v.

Tahiri M, Tressol JC, Arnaud J, Bornet FR, Bouteloup-Demange C, Feillet-Coudray C, et al. Effect of short-chain fructooligosaccharides on intestinal calcium absorption and calcium status in postmenopausal women: a stable-isotope study. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77:449–57.

Teshima E. *Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probiótico, prebiótico e simbiótico*. [Tese Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa; 2001. 113p.

Weaver CM, Martin BR, Story JA, Hutchinson I, Sanders L. Novel Fibers Increase Bone Calcium Content and Strength beyond Efficiency of Large Intestine Fermentation. *J. Agric. Food Chem*. 2010; 58: 8952–8957.

Won HY, Lee JA, Park ZS, Song JS, Kim HY, Jang SM, et al. Prominent Bone Loss Mediated by RANKL and IL-17 Produced by CD4+ T Cells in TallyHo/JngJ Mice. *PLoS One* 2011; 6(3):e18168.

World Health Organization. *Ageing and Life Course - Washington (DC): The Department of Ageing and Life Course (ALC); 2010*. Available: <<http://www.who.int/fch/depts/alc/en/index.html>>. [Accessed 2010 nov 21].

Yıldız S. The Metabolism of Fructooligosaccharides and Fructooligosaccharide-Related Compounds in Plants. *Food Reviews International*. 2011; 27: 16-50.

Zafar TA, Weaver CM, Zhao Y, Martin BR, Wastney ME. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J. Nutr*. 2004; 123: 399–402.

Zhang Y, Lai WP, et al. Effects of fructus ligustri lucidi extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(2): 291-6.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo é pioneiro na literatura ao informar sobre o efeito prebiótico do PBY na modulação de indicadores da saúde óssea de ratas adultas intactas, ovariectomizadas e celiotomizadas (não ovariectomizadas – SHAM).

Fase 1 do experimento:

Conclui-se que a exposição de ratas (em condições clínicas adequadas) a dose de 6% de FOS/Inulina de um produto a base de yacon, por um período de 90 dias exerce efeitos clínicos promissores em relação a maior produção de acetato e lactato; a menor excreção de cálcio fecal; e maior absorção aparente fracional, maior absorção aparente percentual, maior balanço mineral e maior percentual de retenção de cálcio. Estes resultados presumem impacto positivo, a longo prazo, no metabolismo ósseo.

Fases 2 e 3 do experimento:

O grupo de ratas que recebeu o produto a base de yacon na dieta apresentou maior peso relativo do ceco e maior concentração de acetato e lactato no conteúdo cecal.

Em termos clínicos observou-se que a dieta com PBY diminuiu nas ratas OVX (sem ovários) e SHAM (com ovários) os níveis de excreção de cálcio nas fezes e urina com impacto positivo e significativo na absorção e retenção de cálcio corporal.

Os níveis séricos de FA foram maiores no grupo PBY comparado ao grupo controle, não sendo observada diferença significativa entre as ratas OVX e SHAM. As ratas OVX alimentadas com PBY apresentaram maiores níveis de fosfatase alcalina.

No grupo PBY os níveis séricos do marcador de reabsorção óssea NTx, que normalmente mostram-se elevados na deficiência de estrogênio, foram menores. Isso poderia indicar atenuação do processo de perda óssea nas ratas ovariectomizadas.

As propriedades biomecânicas tanto da cabeça do fêmur quanto da diáfise femural apresentaram valores percentuais maiores no grupo PBY, o que pressupõe maior resistência óssea.

Há perspectivas que o PBY possa ser uma alternativa promissora para atenuar os efeitos deletérios no metabolismo ósseo advindos da osteopenia em modelo animal. Ressalta-se que o impacto da deficiência de estrogênio (ovariectomia) combinada a uma dieta contendo produto à base de yacon (fonte de frutanos tipo inulina que potencializam a absorção de cálcio) demanda mais investigações sistemáticas mas os indícios encontrados neste estudo são positivos.

Sugere-se um período maior de exposição à osteopenia (tempo pós ovariectomia) concomitante a intervenção dietética com PBY. Sabe-se que é elevado o custo para manter os animais por um longo período experimental, mas é necessário mais tempo de intervenção para melhores elucidacões.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association Official Analytical Chemists – AOAC. Official Methods of Analysis. Gaithersburg; 16th ed., 1997.

Arai, S. Global view on functional foods: asian perspectives. *British J Nutri.* 2002; 88 (Suppl 2): S139-S43.

Cheng M, Wang Q, Fan Y, Liu X, Wang L, Xie R, Ho CC, Sun W. A traditional Chinese herbal preparation, Er-Zhi-Wan, prevent ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2011; 18;138(2):279-85.

Costa, NMBC. Minerais. In: Costa NMBC, Pelúzio MCG. *Nutrição Básica e Metabolismo.* Viçosa: Editora UFV, 2008, 1^a ed. 263-359.

Fernandes BB. Influência de diferentes tipos de exercício sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras. *Dissertação [Mestrado].* Universidade Federal de Viçosa; 2010. 57p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) – FAO Technical Meeting on Prebiotics. (2007). Food Quality and Standards Service (AGNS), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), September 15-16.
<http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics_Tech_Meeting_Report.pdf.>
6.26.2010.

Franco FSC. Efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbio associados à adequação ou não de cálcio alimentar na composição corporal, no tecido ósseo e no balanço de cálcio em ratas. *Tese [Doutorado].* Universidade Federal de Viçosa; 2009. 206p.

Guigoz Y, Rochat F, Carrier-Perruisseau G, Rochat I, Schiffrin EJ. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutrition Research.* 2002; 22: 13-25.

Lobo AR, Colli C, Alvares EP, Filisetti TMCC. 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* 2007; 97:776–785.

Lobo AR, Cocato ML, Jorgetti V, Sá LRM, Nakano EY, Colli C. Changes in bone mass, biomechanical properties and microarchitecture of calcium- and iron-deficient rats fed diets supplemented with inulin-type fructans. *Nutrition Research* 2009; 29:873-881.

Mezadri TJ, Tomaz VA, Amaral VLL. *Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental.* Florianópolis, Editora: UFSC, 2004. 155p.

Oliveira Junior GI. Influência do resíduo fibroso da moagem de milho micropulverizado na biodisponibilidade de ferro, zinco e cálcio em ratas. Dissertação [Mestrado]. Universidade Federal de Viçosa; 2009.

Pinheiro MM, Neto ETR, Machado FS, Omura F, Yang JH K, Szejnfeld J, Szejnfeld VL. Fatores de risco para fratura por osteoporose e baixa densidade óssea em mulheres na pré e pós-menopausa. Rev Saúde Pública 2010; 44(3):479-85.

Reeves P, Nielsen F, Fahey G. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN - 76 A Rodent Diet. Journal of Nutrition 1993; 123:1939–1951.

Rodrigues FC, Castro ASB, Rodrigues VC, Fernandes SA, Fontes EAF, Oliveira TT, Martino HSD, Ferreira CLLF. Yacon Flour and Bifidobacterium longum Modulate Bone Health in Rats. J Med Food 2012; 15(7): 664–670.

Silva JD. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 2 ed., Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1990, 165 p.

Statistical Analysis System – SAS. User's procedures guide. Version 9.1. Cary: SAS Institute, Inc 1989. 2v.

Smiricky-Tjardes MR. et al. (2003). Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. J Anim Sci 81: 2535-2545.

Teshima E. Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probiótico, prebiótico e simbiótico. [Tese Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa; 2001. 113p.

Zhang R, Hu SJ, Li C, Zhang F, Gan HQ, Mei QB. J Achyranthes bidentata root extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. Ethnopharmacol. 2012; 6;139(1):12-8.

8. ANEXOS

8.1. Termo de aprovação da pesquisa com animais pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

Viçosa, 29 de agosto de 2011.

Ilma. Sra.
Professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
Departamento de Tecnologia de Alimentos

Senhora Coordenadora:

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa nº 55/2011 e intitulado "*Efeito do yacon (Smallanthus sonchifolius) na modulação de indicadores da saúde óssea em modelo murino*", a CEUA/UFV emitiu parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e na legislação vigente.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cláudio César Fonseca', written over a faint circular stamp.

Professor Cláudio César Fonseca

Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV - CEUA

/rhs.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA / UFV certifica que o processo n.º 55 / 2011, intitulado “*Efeito do yacon (Smallanthus sonchifolius) na modulação de indicadores da saúde óssea em modelo murino*” coordenado pela professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 24/08/2011.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use / UFV certify that the process number 55 / 2011, named “*Effect of yacon (Smallanthus sonchifolius) in the modulation of indicators of bone health in murine model*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on August 24, 2011 approved this process.

Viçosa, 24 de agosto de 2011.

Professor Cláudio César Fonseca

Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV - CEUA
Coordenador

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice I

Tabelas da análise de variância referente aos dados do artigo: “Fecal score and cecum profile of Wistar rats fed a novel yacon based product source of Fructooligosacarídeos/inulina”

Tabela A. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com a concentração de FOS/inulina do yacon (*Smillanthus sonchifolius*).

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
GP	Concentração FOS/inulina	4	75,8300	0,9083
	Resíduo	10	313,8000	
CEA	Concentração FOS/inulina	4	0,0003	0,9141
	Resíduo	10	0,0011	
PRC	Concentração FOS/inulina	4	0,0001	0,0017
	Resíduo	10	0,0001	
PF	Concentração FOS/inulina	4	136,2600	0,0001
	Resíduo (a)	10	7,1900	
	Dias	24	6,2000	
	Concentração FOS/inulina *	96	2,8900	
	Resíduo (b)	240	3,4200	
UF	Concentração FOS/inulina	4	887,7900	0,0102
	Resíduo	10	149,1000	
pH cecal	Concentração FOS/inulina	4	0,1447	0,2882
	Resíduo	10	0,0998	
Propionato	Concentração FOS/inulina	4	475,8900	0,0761
	Resíduo	10	162,0200	
Acetato	Concentração FOS/inulina	4	278,0300	0,0168
	Resíduo	10	54,5700	
Butirato	Concentração FOS/inulina	4	1107,9500	0,0445
	Resíduo	10	304,8000	
NCC	Concentração FOS/inulina	4	2,0100	0,9338
	Resíduo	10	10,1600	
PCC	Concentração FOS/inulina	4	946,6700	0,1970
	Resíduo	10	513,2400	
DBCC	Concentração FOS/inulina	4	31,0700	0,4361
	Resíduo	10	30,0400	
DACC	Concentração FOS/inulina	4	9,5100	0,8834
	Resíduo	10	33,7900	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; GP: Ganho de peso; CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar; PRC: peso relativo do ceco; PF: Peso das fezes; UF: Umidade das fezes; NCC: nº de criptas do ceco por campo microscópico; PCC: profundidade das criptas do ceco; DBCC: diâmetro basal de criptas do ceco; DACC: diâmetro apical de criptas do ceco. Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer*.

Tabela B. Modelos de equação de regressão da variação do peso relativo do ceco (PRC), umidade das fezes (UF) e acetato em função da concentração de FOS/inulina e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (P).

Variável	Modelo de regressão	R^2	Prob>F
PRC	$0,0043 + 0,0004X$	0,9727	< 0,0001
UF	$15,7760 + 4,5637X$	0,9642	0,0002
Acetato	$51,4141 - 1,8055X$	0,4819	0,0270

X = Concentração de FOS/inulina

9.2. Apêndice II

Tabelas da análise de variância referente aos dados do artigo:

“Produto à base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) modula biomarcadores do metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas?”

Tabela A. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta.

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
GP	Dieta	1	6020,0600	0,0007
	Cirurgia	1	1140,3100	0,1218
	Dieta * Cirurgia	1	726,7600	0,2149
	Resíduo	55	461,6400	
CA	Dieta	1	144592,4100	0,0004
	Cirurgia	1	9719,0500	0,3367
	Dieta * Cirurgia	1	816,0900	0,7799
	Resíduo	55	10348,0800	
CEA	Dieta	1	0,0042	0,0002
	Cirurgia	1	0,0006	0,1393
	Dieta * Cirurgia	1	0,0005	0,1863
	Resíduo	55	0,0003	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); GP: Ganho de peso; CA: Consumo alimentar total; CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar. *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela B. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta.

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
PRC	Dieta	1	2,4900	0,0007
	Cirurgia	1	1,9400	0,1113
	Dieta * Cirurgia	1	7,0100	0,1858
	Resíduo	59	0,500	
pH cecal	Dieta	1	0,1300	0,2337
	Cirurgia	1	0,1900	0,1494
	Dieta * Cirurgia	1	0,0500	0,4729
	Resíduo	60	0,0900	
Acetato	Dieta	1	858,0700	0,0433
	Cirurgia	1	1,8900	0,9231
	Dieta * Cirurgia	1	107,1700	0,4684
	Resíduo	60	201,2900	
Butirato	Dieta	1	525,9800	0,0920
	Cirurgia	1	0,0200	0,9910
	Dieta * Cirurgia	1	97,3900	0,4641
	Resíduo	60	179,3900	
Propionato	Dieta	1	156,1700	0,1094
	Cirurgia	1	0,4400	0,9312
	Dieta * Cirurgia	1	58,4900	0,3240
	Resíduo	60	59,1500	
Lactato	Dieta	1	11,8500	<0,0001
	Cirurgia	1	0,1100	0,6835
	Dieta * Cirurgia	1	0,0600	0,7675
	Resíduo	60	0,6500	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela C. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores ovário e dieta.

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
CF	Dieta	1	0,0200	0,9028
	Cirurgia	1	1,9600	0,2568
	Dieta * Cirurgia	1	1,5000	0,3205
	Resíduo	60	1,4900	
DMO	Dieta	1	0,0006	0,4266
	Cirurgia	1	0,0028	0,1088
	Dieta * Cirurgia	1	0,0005	0,4956
	Resíduo	60	0,0010	
CMO	Dieta	1	0,0010	0,5758
	Cirurgia	1	0,0001	0,9189
	Dieta * Cirurgia	1	0,0042	0,2722
	Resíduo	60	0,0034	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); CF: comprimento do fêmur; DMO: densidade mineral óssea; CMO: conteúdo mineral ósseo; *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela D. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta. (Cabeça do Fêmur)

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
Fmáx	Dieta	1	87,6700	0,7281
	Cirurgia	1	705,8900	0,3257
	Dieta * Cirurgia	1	817,7400	0,2904
	Resíduo	60	718,7800	
Rigidez	Dieta	1	1426,0800	0,6224
	Cirurgia	1	17981,0600	0,0839
	Dieta * Cirurgia	1	21805,2400	0,0576
	Resíduo	60	5820,5300	
Tenacidade	Dieta	1	194,9500	0,5680
	Cirurgia	1	1209,6400	0,1578
	Dieta * Cirurgia	1	226,3500	0,5385
	Resíduo	60	591,3200	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); Fmáx: força máxima; *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela E. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta. (Diáfise do Fêmur)

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
Fmáx	Dieta	1	3916,4900	0,7208
	Cirurgia	1	12001,6900	0,5320
	Dieta * Cirurgia	1	49915,1100	0,2049
	Resíduo	59	30372,3900	
Rigidez	Dieta	1	1053,9100	0,9767
	Cirurgia	1	6484,0100	0,9423
	Dieta * Cirurgia	1	58892,5900	0,8272
	Resíduo	56	1224929,0200	
Módulo de Elasticidade	Dieta	1	347506,7100	0,6399
	Cirurgia	1	78466,2700	0,8239
	Dieta * Cirurgia	1	16314,0300	0,9192
	Resíduo	57	1570526,9100	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); Fmáx: força máxima; *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela F. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta.

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
Cálcio	Dieta	1	48,0400	0,1274
	Cirurgia	1	1,1000	0,8153
	Dieta * Cirurgia	1	11,6400	0,4496
	Resíduo	59	20,0900	
Fósforo	Dieta	1	0,1700	0,7978
	Cirurgia	1	0,2700	0,7497
	Dieta * Cirurgia	1	0,3600	0,7094
	Resíduo	59	2,6000	
Magnésio	Dieta	1	0,0035	0,0617
	Cirurgia	1	0,0012	0,2629
	Dieta * Cirurgia	1	0,0006	0,4246
	Resíduo	59	0,0009	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela G. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta.

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
FA	Dieta	1	7372,9800	<0,0010
	Cirurgia	1	602,9600	0,1110
	Dieta * Cirurgia	1	2037,8400	0,0049
	Resíduo	35	225,5000	
NTx	Dieta	1	1065,2900	0,0230
	Cirurgia	1	654,6300	0,0707
	Dieta * Cirurgia	1	67,2000	0,5544
	Resíduo	36	188,7600	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); FA: Fosfatase Alcalina; NTx: Telopectídeo N-terminal do colágeno tipo I. *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela H. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta.

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
CaIngerido (mg/dia)	Dieta	1	27,1500	0,6528
	Cirurgia	1	49,0200	0,5458
	Dieta * Cirurgia	1	0,3400	0,9594
	Resíduo	60	132,8000	
CaUrina (mg/dia)	Dieta	1	153,7900	0,2693
	Cirurgia	1	384,0100	0,0832
	Dieta * Cirurgia	1	118,6900	0,3313
	Resíduo	60	123,7100	
CaFezes (mg/dia)	Dieta	1	568,7700	0,0016
	Cirurgia	1	5,9400	0,7368
	Dieta * Cirurgia	1	1,0300	0,8886
	Resíduo	60	52,1200	

Ca: cálcio; FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); FA: Fosfatase Alcalina; NTx: Telopectídeo N-terminal do colágeno tipo I. *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

Tabela I. Resumo da ANOVA das variáveis testadas de acordo com os fatores cirurgia e dieta.

Variável	FV	GL	QM	Prob > F
Absorção Aparente fracional	Dieta	1	844,4800	0,0447
	Cirurgia	1	20,8300	0,7485
	Dieta * Cirurgia	1	0,1800	0,9761
	Resíduo	60	200,8600	
Absorção Aparente %	Dieta	1	696,7200	0,0011
	Cirurgia	1	0,1542	0,9594
	Dieta * Cirurgia	1	0,0010	0,9969
	Resíduo	60	58,9900	
Balanço Mineral	Dieta	1	1719,0500	0,0073
	Cirurgia	1	225,9500	0,3177
	Dieta * Cirurgia	1	109,5800	0,4856
	Resíduo	60	222,5700	
% Retenção Mineral	Dieta	1	1434,0100	0,0017
	Cirurgia	1	285,0800	0,1480
	Dieta * Cirurgia	1	107,2200	0,3723
	Resíduo	60	132,7200	

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Cirurgia (OVX ou SHAM); Dieta (Controle ou com 6% de FOS/inulina do produto a base de yacon - PBY); FA: Fosfatase Alcalina; NTx: Telopectideo N-terminal do colágeno tipo I. *Nível de significância: 5% de probabilidade pelo teste de Fischer.

9.3. Apêndice III - Dados brutos do estudo

9.3.1. Dados brutos do artigo: “Fecal score and cecum profile of Wistar rats fed a novel yacon based product source of Fructooligosaccharides/inulin”

Quadro A. Ganho de peso por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	Ganho de peso (g)
G0	0	109
G0	0	121
G0	0	108
G5	5	113
G5	5	72
G5	5	121
G6	6	97
G6	6	118
G6	6	122
G7,5	7,5	131
G7,5	7,5	126
G7,5	7,5	88
G10	10	101
G10	10	120
G10	10	108

Quadro B. Coeficiente de eficiência alimentar (CEA) por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	CEA
G0	0	0,2243
G0	0	0,2150
G0	0	0,2230
G5	5	0,2122
G5	5	0,1305
G5	5	0,2517
G6	6	0,2111
G6	6	0,1813
G6	6	0,2400
G7,5	7,5	0,2262
G7,5	7,5	0,1704
G7,5	7,5	0,2128
G10	10	0,2154
G10	10	0,1966
G10	10	0,1854

Quadro C. Peso Relativo do Ceco (PRC) por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	PRC
G0	0	0,0039
G0	0	0,0048
G0	0	0,0046
G5	5	0,0073
G5	5	0,0069
G5	5	0,0048
G6	6	0,0080
G6	6	0,0069
G6	6	0,0060
G7,5	7,5	0,0062
G7,5	7,5	0,0073
G7,5	7,5	0,0080
G10	10	0,0091
G10	10	0,0090
G10	10	0,0087

Quadro D. Peso Fecal por grupo (n=3) durante 25 dias.

Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
0	0,94
0	0,79
0	0,81
0	0,67
0	0,81
0	0,79
0	0,65
0	0,78
0	0,91
0	0,90
0	0,90
0	0,99
0	0,90
0	0,72
0	1,10
0	1,35
0	1,35
0	1,03
0	1,27

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
0	1,32
0	1,24
0	2,01
0	1,30
0	1,20
0	0,83
0	1,59
0	1,29
0	0,83
0	1,59
0	1,29
0	1,18
0	1,05
0	1,55
0	1,18
0	1,05
0	1,55
0	1,45
0	1,43
0	1,72
0	1,45
0	1,43
0	1,72
0	1,00
0	1,18
0	1,68
0	1,37
0	1,34
0	1,17
0	1,37
0	1,34
0	1,17
0	1,34
0	1,69
0	1,09
0	0,94
0	1,08
0	1,22
0	1,24
0	1,22
0	0,64

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
0	2,03
0	1,28
0	1,37
0	1,60
0	1,70
0	1,70
0	1,08
0	1,32
0	1,19
0	1,08
0	1,32
0	1,19
0	1,51
0	0,70
0	1,32
5	1,24
5	1,43
5	1,29
5	1,45
5	1,65
5	1,51
5	2,68
5	1,59
5	1,21
5	1,72
5	2,02
5	1,02
5	1,97
5	2,07
5	1,96
5	2,19
5	2,02
5	2,13
5	3,07
5	2,49
5	2,43
5	3,15
5	1,65
5	2,50
5	1,56
5	2,49

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
5	1,76
5	1,56
5	2,49
5	1,76
5	2,38
5	2,24
5	2,49
5	2,38
5	2,24
5	2,49
5	2,63
5	1,93
5	2,04
5	2,63
5	1,93
5	2,04
5	2,99
5	3,45
5	2,53
5	3,01
5	2,61
5	2,13
5	4,88
5	2,55
5	2,00
5	6,60
5	2,75
5	1,68
5	1,58
5	3,50
5	2,73
5	2,37
5	2,09
5	1,51
5	5,39
5	0,24
5	2,18
5	2,60
5	0,22
5	1,86
5	2,60

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
5	0,22
5	1,86
5	3,11
5	0,10
5	1,13
5	2,01
5	1,21
5	0,90
6	1,13
6	1,17
6	1,46
6	1,70
6	20,30
6	1,86
6	1,54
6	1,66
6	1,27
6	1,30
6	2,52
6	1,88
6	2,61
6	2,67
6	2,99
6	3,06
6	3,05
6	2,74
6	3,87
6	2,02
6	2,02
6	2,67
6	1,43
6	2,65
6	2,67
6	1,43
6	2,65
6	2,93
6	1,69
6	3,43
6	2,93
6	1,69
6	3,43

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
6	1,91
6	2,24
6	2,83
6	1,91
6	2,25
6	2,83
6	5,74
6	2,32
6	2,53
6	2,97
6	2,05
6	2,85
6	2,97
6	2,05
6	2,85
6	4,14
6	2,65
6	2,85
6	4,78
6	2,20
6	1,98
6	5,55
6	2,59
6	2,04
6	1,78
6	2,05
6	2,14
6	4,30
6	2,69
6	5,82
6	2,60
6	2,57
6	2,43
6	2,60
6	2,57
6	2,43
6	2,15
6	3,33
6	2,59
6	2,86
6	1,36

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
6	3,71
7,5	2,44
7,5	3,07
7,5	2,80
7,5	2,66
7,5	2,46
7,5	2,48
7,5	4,85
7,5	2,04
7,5	4,98
7,5	2,18
7,5	3,14
7,5	4,25
7,5	2,22
7,5	3,36
7,5	4,51
7,5	5,08
7,5	2,07
7,5	3,12
7,5	4,15
7,5	3,95
7,5	4,62
7,5	3,12
7,5	4,85
7,5	2,99
7,5	3,12
7,5	4,85
7,5	2,99
7,5	4,66
7,5	3,15
7,5	6,11
7,5	4,66
7,5	3,15
7,5	6,11
7,5	3,50
7,5	4,79
7,5	5,01
7,5	3,50
7,5	4,79
7,5	5,01
7,5	4,39

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
7,5	2,67
7,5	5,57
7,5	3,81
7,5	2,29
7,5	5,85
7,5	3,81
7,5	2,29
7,5	5,85
7,5	4,55
7,5	2,19
7,5	9,26
7,5	5,33
7,5	3,40
7,5	6,93
7,5	4,26
7,5	0,88
7,5	8,97
7,5	3,71
7,5	3,54
7,5	5,74
7,5	3,90
7,5	3,92
7,5	7,78
7,5	4,12
7,5	2,86
7,5	3,48
7,5	4,12
7,5	2,86
7,5	3,48
7,5	2,37
7,5	4,26
7,5	3,38
7,5	1,40
7,5	4,23
7,5	4,32
10	2,31
10	2,86
10	1,50
10	2,39
10	6,99
10	2,65

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
10	2,46
10	3,98
10	2,45
10	2,74
10	4,93
10	1,63
10	2,79
10	2,11
10	0,87
10	6,61
10	9,97
10	1,52
10	4,77
10	5,31
10	1,21
10	3,77
10	5,41
10	0,61
10	3,77
10	5,41
10	0,61
10	4,65
10	2,54
10	0,72
10	4,65
10	2,54
10	0,72
10	4,77
10	3,83
10	1,60
10	4,77
10	3,83
10	1,60
10	5,23
10	3,54
10	4,70
10	6,71
10	1,98
10	5,77
10	6,71
10	1,98

Continuação...	
Concentração FOS/inulina (%)	Peso Fecal (g)
10	5,77
10	5,66
10	6,10
10	7,00
10	4,64
10	3,43
10	14,47
10	3,72
10	3,98
10	11,78
10	3,52
10	3,81
10	10,61
10	6,57
10	4,02
10	12,70
10	4,72
10	4,10
10	10,90
10	4,72
10	4,10
10	10,90
10	4,59
10	4,90
10	12,96

Quadro E. Umidade das Fezes (UF) por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	UF
G0	0	17,5014
G0	0	14,4634
G0	0	12,3232
G5	5	58,6843
G5	5	35,9005
G5	5	23,6386
G6	6	47,1806
G6	6	39,0044
G6	6	38,0987
G7,5	7,5	52,7017
G7,5	7,5	45,6519
G7,5	7,5	67,2503
G10	10	55,7310
G10	10	42,8714
G10	10	75,8419

Quadro F. pH cecal por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	pH
G0	0	6,35
G0	0	6,51
G0	0	6,42
G5	5	6,67
G5	5	6,19
G5	5	6,57
G6	6	5,64
G6	6	6,49
G6	6	6,50
G7,5	7,5	6,49
G7,5	7,5	6,72
G7,5	7,5	6,90
G10	10	6,60
G10	10	7,18
G10	10	6,47

Quadro G. Concentração de Propionato por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	Propionato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
G0	0	36,74
G0	0	37,42
G0	0	35,20
G5	5	44,67
G5	5	21,75
G5	5	54,64
G6	6	40,39
G6	6	61,24
G6	6	57,54
G7,5	7,5	18,86
G7,5	7,5	49,33
G7,5	7,5	55,45
G10	10	13,82
G10	10	19,16
G10	10	21,80

Quadro H. Concentração de Acetato por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	Acetato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
G0	0	48,44
G0	0	42,64
G0	0	47,33
G5	5	40,22
G5	5	42,12
G5	5	53,90
G6	6	36,66
G6	6	46,52
G6	6	55,71
G7,5	7,5	31,39
G7,5	7,5	49,88
G7,5	7,5	50,00
G10	10	25,44
G10	10	24,47
G10	10	22,06

Quadro I. Concentração de Butirato por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	Butirato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
G0	0	33,83
G0	0	29,48
G0	0	36,98
G5	5	33,78
G5	5	13,24
G5	5	50,66
G6	6	52,22
G6	6	80,81
G6	6	73,28
G7,5	7,5	16,57
G7,5	7,5	49,32
G7,5	7,5	74,41
G10	10	13,16
G10	10	28,84
G10	10	10,56

Quadro J. Número de criptas do ceco por campo microscópico (NCCM) (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	NCCM
G0	0	19,8611
G0	0	11,2222
G0	0	18,2777
G5	5	18,0370
G5	5	14,4074
G5	5	11,6666
G6	6	13,1851
G6	6	15,2222
G6	6	20,1111
G7,5	7,5	14,2222
G7,5	7,5	16,1851
G7,5	7,5	15,3571
G10	10	12,7777
G10	10	13,9259
G10	10	17,4074

Quadro K. Diâmetro basal das criptas do ceco (DBCC) por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	DBC (μm)
G0	0	44,2367
G0	0	51,8758
G0	0	41,2856
G5	5	51,7476
G5	5	38,1601
G5	5	54,8315
G6	6	48,8997
G6	6	49,6848
G6	6	48,5854
G7,5	7,5	45,8498
G7,5	7,5	56,1718
G7,5	7,5	56,9173
G10	10	51,9748
G10	10	52,6809
G10	10	55,3025

Quadro L. Diâmetro apical das criptas do ceco (DACC) por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	DACC (μm)
G0	0	29,1375
G0	0	38,3999
G0	0	29,1123
G5	5	28,4826
G5	5	25,0609
G5	5	39,6266
G6	6	31,3224
G6	6	24,8262
G6	6	33,4113
G7,5	7,5	26,0734
G7,5	7,5	26,5282
G7,5	7,5	38,1551
G10	10	24,5100
G10	10	25,8600
G10	10	31,8600

Quadro M. Profundidade das criptas do ceco (PCC) por grupo (n=3)

Grupo	Concentração FOS/inulina (%)	PCC (μm)
G0	0	143,64
G0	0	185,46
G0	0	123,15
G5	5	173,92
G5	5	139,72
G5	5	184,07
G6	6	169,36
G6	6	159,28
G6	6	174,04
G7,5	7,5	186,63
G7,5	7,5	182,89
G7,5	7,5	209,24
G10	10	192,41
G10	10	161,45
G10	10	216,35

9.3.2. Dados brutos do artigo: “Produto a base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) contribui favoravelmente ao metabolismo ósseo de ratas *Wistar*”

Quadro A. Dados de desempenho dos animais por grupo (n=8)

Grupo	GP (g)	CA (g)	CEA
Controle	142	1599,19	0,0887
Controle	224	1839,39	0,1217
Controle	187	1616,3	0,1156
Controle	194	1809,54	0,1072
Controle	190	1779,71	0,1067
Controle	177	1699,27	0,1041
Controle	145	1439,6	0,1007
Controle	204	1928,96	0,1057
PBY	125	1964,93	0,0636
PBY	111	1906,39	0,0582
PBY	170	1949,37	0,0872
PBY	138	2075,3	0,0664
PBY	132	2073,3	0,0636
PBY	153	1855,56	0,0824
PBY	148	1753,384	0,0844
PBY	159	1946,91	0,0816

PBY: Produto à base de yacon; GP: ganho de peso; CA: consumo alimentar; CEA: coeficiente de eficiência Alimentar

Quadro B. Peso relativo do ceco (PRC) por grupo (n=8)

Grupo	PRC
Controle	0,0037
Controle	0,0049
Controle	0,0031
Controle	0,0028
Controle	0,0038
Controle	0,0029
Controle	0,0043
Controle	0,0025
PBY	0,0047
PBY	0,0060
PBY	0,0044
PBY	0,0043
PBY	0,0055
PBY	0,0053
PBY	0,0040
PBY	0,0045

PBY: Produto à base de yacon

Quadro C. pH cecal por grupo (n=8)

Grupo	pH
Controle	6,28
Controle	6,73
Controle	6,76
Controle	7,07
Controle	6,85
Controle	6,78
Controle	6,65
Controle	6,99
PBY	6,59
PBY	6,82
PBY	6,76
PBY	6,14
PBY	6,96
PBY	6,92
PBY	6,91
PBY	6,73

PBY: Produto à base de yacon

Quadro D. Concentração de ácidos orgânicos por grupo (n=8)

Grupo	Acetato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Propionato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Butirato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Lactato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	15,79	4,59	14,23	1,69
Controle	72,56	28,62	64,94	1,22
Controle	6,27	1,69	6,035	0,57
Controle	39,34	14,46	35,52	1,64
Controle	55,45	18,59	41,44	1,31
Controle	37,64	7,88	27,20	0,28
Controle	41,25	10,14	30,55	1,08
Controle	35,65	14,77	31,98	2,06
PBY	23,69	9,61	20,12	2,56
PBY	110,20	4,43	56,22	5,75
PBY	11,75	3,19	11,00	0,77
PBY	39,03	13,21	33,85	3,60
PBY	36,73	13,41	28,18	3,51
PBY	45,70	17,19	33,67	3,52
PBY	35,81	15,17	24,55	2,62
PBY	31,02	13,01	22,66	3,64

PBY: Produto à base de yacon

Quadro E. Cálcio urinário e fecal por grupo (n=8)

Grupo	CaU (mg)	CaF (mg)
Controle	3,80	35,46
Controle	18,91	32,35
Controle	14,09	42,24
Controle	23,22	37,13
Controle	34,36	22,83
Controle	30,69	38,00
Controle	24,66	22,51
Controle	3,41	19,25
PBY	5,64	23,42
PBY	7,06	25,62
PBY	31,08	19,24
PBY	7,22	25,56
PBY	24,32	22,28
PBY	29,69	18,38
PBY	22,97	23,05
PBY	24,40	26,88

PBY: Produto à base de yacon; CaU: cálcio urinário; CaF: cálcio fecal

Quadro F. Dados relacionados ao balanço de cálcio por grupo (n=8)

Grupo	Cal (mg)	AAF (mg)	AA (%)	BM (mg)	RM (%)
Controle	98,57	63,11	64,02	59,30	60,16
Controle	112,00	79,64	71,11	60,73	54,22
Controle	107,70	65,45	60,77	51,36	47,69
Controle	120,15	83,01	69,09	59,79	49,76
Controle	113,16	90,32	79,81	55,95	49,44
Controle	117,45	79,44	67,64	48,74	41,50
Controle	102,58	80,07	78,05	55,40	54,01
Controle	111,92	92,67	82,80	89,25	79,74
PBY	100,77	77,34	76,75	71,70	71,15
PBY	98,80	73,17	74,06	66,11	66,91
PBY	121,02	101,78	84,09	70,70	58,41
PBY	106,73	81,17	76,05	73,95	69,28
PBY	94,51	72,23	76,42	47,90	50,68
PBY	120,50	102,11	84,74	72,41	60,09
PBY	94,58	71,53	75,62	48,56	51,33
PBY	112,22	85,33	76,04	60,93	54,29

PBY: Produto à base de yacon; Calng: cálcio ingerido; AAF: absorção aparente fracional; AA: absorção aparente percentual; BM: balanço mineral; RM: percentual de retenção mineral.

Quadro F. Conteúdo mineral ósseo por grupo (n=8)

Grupo	Ca (%)	Mg (%)	P (%)	Peso tibia (g)
Controle	20,19	0,22	9,53	0,58
Controle	15,13	0,16	6,80	0,54
Controle	14,61	0,17	8,99	0,54
Controle	18,95	0,17	7,81	0,58
Controle	20,36	0,21	7,39	0,61
Controle	17,81	0,19	6,99	0,58
Controle	17,83	0,19	7,59	0,62
Controle	25,03	0,25	9,81	0,70
PBY	27,84	0,26	6,43	0,45
PBY	17,80	0,17	7,19	0,52
PBY	22,94	0,21	8,49	0,68
PBY	21,89	0,24	8,99	0,74
PBY	18,09	0,21	7,39	0,69
PBY	24,43	0,23	11,44	0,79
PBY	21,64	0,21	10,42	0,71
PBY	21,78	0,21	9,81	0,74

PBY: produto à base de yacon; Ca: cálcio; Mg: magnésio; P:fósforo.

Quadro G. Níveis séricos dos marcadores de formação e reabsorção óssea por grupo (n=5)

Grupo	FA (U/L)	NTX ng/mL
Controle	74,00	58,31
Controle	57,00	42,24
Controle	35,00	17,06
Controle	28,00	69,93
Controle	36,00	52,59
PBY	42,00	26,99
PBY	23,00	60,23
PBY	18,00	57,84
PBY	44,00	43,49
PBY	61,00	25,68

PBY: produto à base de yacon; FA: Fosfatase Alcalina; NTX: Telopectídeo Aminoterminal do colágeno tipo I

Quadro H. Conteúdo mineral ósseo (CMO), área do fêmur e densidade mineral óssea (DMO) por grupo (n=8)

Grupo	CMO (g)	Área (cm ²)	DMO (g/cm ²)
Controle	0,2900	1,2670	0,2290
Controle	0,2690	1,3130	0,2050
Controle	0,2500	1,1800	0,2120
Controle	0,2660	1,1980	0,2220
Controle	0,2750	1,2200	0,2260
Controle	0,2070	1,0060	0,2060
Controle	0,2620	1,2070	0,2170
Controle	0,3080	1,2400	0,2490
PBY	0,2920	1,2430	0,2350
PBY	0,1870	0,9810	0,1910
PBY	0,3150	1,3500	0,2340
PBY	0,2910	1,1330	0,2570
PBY	0,2460	1,1260	0,2190
PBY	0,3100	1,4250	0,2170
PBY	0,3010	1,2300	0,2450
PBY	0,2710	1,2660	0,2140

PBY: Produto à base de yacon

Quadro I. Força máxima, rigidez e tenacidade da cabeça do fêmur por grupo (n=8)

Grupo	Força máxima (N)	Rigidez (Mpa)	Tenacidade (mJ)
Controle	122,87	193,43	43,50
Controle	155,49	254,20	227,50
Controle	86,09	148,43	34,50
Controle	102,21	138,12	56,30
Controle	126,32	130,45	74,60
Controle	93,77	241,99	29,40
Controle	101,12	84,99	80,30
Controle	123,19	136,20	86,20
PBY	116,79	218,94	69,20
PBY	100,54	202,36	48,90
PBY	140,84	93,57	115,00
PBY	132,91	181,98	60,30
PBY	84,55	194,07	31,00
PBY	142,63	247,40	139,00
PBY	101,50	260,14	48,70
PBY	120,76	126,64	70,00

PBY: produto à base de yacon

Quadro J. Força máxima, rigidez e módulo de elasticidade da diáfise do fêmur por grupo (n=8)

Grupo	Força máxima (N)	Rigidez (Mpa)	Módulo de Elasticidade (Mpa)
Controle	492,87	3551,00	3317,30
Controle	368,03	1766,40	1360,10
Controle	396,36	1275,60	1581,60
Controle	484,62	1309,10	3261,50
Controle	792,46	2513,60	2657,10
Controle	450,28	1831,50	2378,90
Controle	434,35	1958,10	1490,10
Controle	607,43	3346,30	3415,00
PBY	671,26	1710,10	2950,50
PBY	567,26	958,21	1383,70
PBY	435,50	2678,00	1602,40
PBY	683,41	1599,90	1665,70
PBY	394,12	1358,80	2398,40
PBY	615,68	1673,10	1789,60
PBY	474,07	1400,30	1398,20
PBY	116,60	1076,90	1766,40

PBY: produto à base de yacon

9.3.3. Dados brutos do artigo: Produto à base de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) modula biomarcadores do metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas?”

Quadro A. Dados de desempenho dos animais por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Grupo	Cirurgia	GP (g)	CA (g)	CEA
Controle	OVX	8	1213,28	0,0065
Controle	OVX	50	1352,86	0,0369
Controle	OVX	32	1261,65	0,0253
Controle	OVX	11	1067,19	0,0103
Controle	OVX	37	1262,01	0,0293
Controle	OVX	31	1233,09	0,0251
Controle	OVX	59	1394,69	0,0423
Controle	OVX	52	1037,51	0,0501
Controle	OVX	70	1404,63	0,0498
Controle	OVX	40	1148,31	0,0348
Controle	OVX	61	1321,81	0,0461
Controle	OVX	65	1408,35	0,0461
Controle	OVX	57	1487,31	0,0383
Controle	OVX	28	1238,16	0,0226
Controle	OVX	120	1171,22	0,1024
Controle	OVX	66	1360,70	0,0485
Controle	Sham	34	1325,66	0,0256
Controle	Sham	31	1267,51	0,0244
Controle	Sham	64	1327,05	0,0482
Controle	Sham	49	1393,36	0,0351
Controle	Sham	40	1364,04	0,0293
Controle	Sham	47	1184,10	0,0396
Controle	Sham	15	1131,28	0,0132
Controle	Sham	33	1251,82	0,0263
Controle	Sham	22	1242,24	0,0177
Controle	Sham	32	1291,30	0,0247
Controle	Sham	48	1298,95	0,0369
Controle	Sham	27	1251,14	0,0215
Controle	Sham	15	956,94	0,0156
Controle	Sham	21	1158,71	0,0181
Controle	Sham	35	1356,37	0,0258
Controle	Sham	20	1269,44	0,0157
PBY	OVX	18	1557,34	0,0115
PBY	OVX	11	1400,85	0,0078
PBY	OVX	19	1402,23	0,0135
PBY	OVX	30	1355,28	0,0221
PBY	OVX	11	1179,63	0,0093
PBY	OVX	61	1373,33	0,0444
PBY	OVX	6	1251,96	0,0047
PBY	OVX	18	1398,09	0,0128
PBY	OVX	2	1356,07	0,0014
PBY	OVX	44	1472,69	0,0298
PBY	OVX	11	1400,67	0,0078
BY	OVX	30	1450,37	0,0206

Continuação...				
Grupo	Cirurgia	GP (g)	CA (g)	CEA
PBY	OVX	17	1372,39	0,0123
PBY	OVX	28	1342,73	0,0208
PBY	Sham	5	1377,05	0,0036
PBY	Sham	19	1380,55	0,0137
PBY	Sham	5	1371,38	0,0036
PBY	Sham	18	1375,22	0,0130
PBY	Sham	4	1434,08	0,0027
PBY	Sham	30	1419,51	0,0211
PBY	Sham	1	1332,50	0,0008
PBY	Sham	15	1258,91	0,0119
PBY	Sham	104	1321,18	0,0787
PBY	Sham	4	1302,19	0,0030
PBY	Sham	13	1228,42	0,0106
PBY	Sham	19	1298,72	0,0146
PBY	Sham	24	1402,26	0,0171

PBY: Produto à base de yacon; GP: ganho de peso; CA: consumo alimentar; CEA: coeficiente de eficiência alimentar; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro B. Dados do Peso relativo do ceco (PRC) por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Dieta	Cirurgia	PRC
Controle	OVX	0,0039
Controle	OVX	0,0037
Controle	OVX	0,0034
Controle	OVX	0,0038
Controle	OVX	0,0036
Controle	OVX	0,0030
Controle	OVX	0,0031
Controle	OVX	0,0027
Controle	OVX	0,0035
Controle	OVX	0,0041
Controle	OVX	0,0048
Controle	OVX	0,0040
Controle	OVX	0,0043
Controle	OVX	0,0034
Controle	OVX	0,0044
Controle	Sham	0,0030
Controle	Sham	0,0034
Controle	Sham	0,0032
Controle	Sham	0,0031
Controle	Sham	0,0029
Controle	Sham	0,0033
Controle	Sham	0,0038
Dieta	Cirurgia	PRC
Controle	Sham	0,0059
Controle	Sham	0,0041
Controle	Sham	0,0044
Controle	Sham	0,0020
Controle	Sham	0,0029
Controle	Sham	0,0046
Controle	Sham	0,0030
Controle	Sham	0,0051
Controle	Sham	0,0028
PBY	OVX	0,0047
PBY	OVX	0,0052
PBY	OVX	0,0059
PBY	OVX	0,0036
PBY	OVX	0,0043
PBY	OVX	0,0035
PBY	OVX	0,0050
PBY	OVX	0,0038
PBY	OVX	0,0046
PBY	OVX	0,0035
PBY	OVX	0,0034
PBY	OVX	0,0043

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	PRC
PBY	OVX	0,0060
PBY	OVX	0,0035
PBY	OVX	0,0038
PBY	OVX	0,0042
PBY	Sham	0,0039
PBY	Sham	0,0043
PBY	Sham	0,0038
PBY	Sham	0,0036
PBY	Sham	0,0036
PBY	Sham	0,0042
PBY	Sham	0,0040
PBY	Sham	0,0041
PBY	Sham	0,0038
PBY	Sham	0,0033
PBY	Sham	0,0036
PBY	Sham	0,0034
PBY	Sham	0,0034
PBY	Sham	0,0040
PBY	Sham	0,0043
PBY	Sham	0,0030

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro C. Dados do pH cecal por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Dieta	Cirurgia	pH
Controle	OVX	6,82
Controle	OVX	6,80
Controle	OVX	6,66
Controle	OVX	6,89
Controle	OVX	6,49
Controle	OVX	7,10
Controle	OVX	6,79
Controle	OVX	6,57
Controle	OVX	6,90
Controle	OVX	6,97
Controle	OVX	6,92
Controle	OVX	6,94
Controle	OVX	6,93
Controle	OVX	6,52
Controle	OVX	7,12
Controle	OVX	6,44
Controle	Sham	6,85
Controle	Sham	6,82
Controle	Sham	7,07
Controle	Sham	6,33
Controle	Sham	6,69
Controle	Sham	6,59
Controle	Sham	6,98
Controle	Sham	6,80
Controle	Sham	5,15
Controle	Sham	6,90
Controle	Sham	6,12
Controle	Sham	6,87
Controle	Sham	6,96
Controle	Sham	6,74
Controle	Sham	6,74
PBY	Sham	6,95
PBY	OVX	7,03
PBY	OVX	6,72
PBY	OVX	6,97
PBY	OVX	6,91
PBY	OVX	6,83
PBY	OVX	6,98
PBY	OVX	6,36
PBY	OVX	6,89
PBY	OVX	6,72
PBY	OVX	6,36

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	pH
PBY	OVX	6,85
PBY	OVX	6,91
PBY	OVX	7,10
PBY	OVX	6,74
PBY	OVX	7,08
PBY	OVX	7,15
PBY	Sham	6,71
PBY	Sham	6,71
PBY	Sham	6,98
PBY	Sham	6,48
PBY	Sham	7,18
PBY	Sham	6,72
PBY	Sham	6,84
PBY	Sham	6,97
PBY	Sham	7,00
PBY	Sham	6,54
PBY	Sham	6,77
PBY	Sham	7,11
PBY	Sham	6,51
PBY	Sham	6,49
PBY	Sham	6,73
PBY	Sham	6,63

PBY: Produto à base de yacon;
 OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro D. Dados da concentração de Acetato por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Dieta	Cirurgia	Acetato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	OVX	41,25
Controle	OVX	40,47
Controle	OVX	21,48
Controle	OVX	25,78
Controle	OVX	9,24
Controle	OVX	37,70
Controle	OVX	31,54
Controle	OVX	24,63
Controle	OVX	20,31
Controle	OVX	29,11
Controle	OVX	13,94
Controle	OVX	20,11
Controle	OVX	52,75
Controle	OVX	15,89

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	Acetato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	OVX	22,75
Controle	OVX	18,94
Controle	Sham	50,97
Controle	Sham	26,59
Controle	Sham	11,02
Controle	Sham	27,40
Controle	Sham	19,83
Controle	Sham	28,72
Controle	Sham	7,21
Controle	Sham	22,05
Controle	Sham	14,09
Controle	Sham	6,98
Controle	Sham	5,69
Controle	Sham	32,29
Controle	Sham	34,79
Controle	Sham	28,62
Controle	Sham	45,51
Controle	Sham	17,32
PBY	OVX	19,43
PBY	OVX	21,04
PBY	OVX	60,66
PBY	OVX	30,25
PBY	OVX	33,08
PBY	OVX	34,49
PBY	OVX	5,18
PBY	OVX	47,81
PBY	OVX	39,65
PBY	OVX	36,50
PBY	OVX	26,92
PBY	OVX	29,08
PBY	OVX	18,12
PBY	OVX	45,92
PBY	OVX	33,83
PBY	OVX	19,73
PBY	Sham	20,30
PBY	Sham	21,70
PBY	Sham	67,75
PBY	Sham	57,01
PBY	Sham	16,86
PBY	Sham	36,58
PBY	Sham	43,42
PBY	Sham	25,10
PBY	Sham	35,04

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	Acetato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
PBY	Sham	51,80
PBY	Sham	51,55
PBY	Sham	7,03
PBY	Sham	43,74
PBY	Sham	23,32
PBY	Sham	10,04
PBY	Sham	26,32

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro E. Dados da concentração de Propionato por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Dieta	Cirurgia	Propionato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	OVX	25,06
Controle	OVX	19,88
Controle	OVX	8,22
Controle	OVX	12,89
Controle	OVX	3,71
Controle	OVX	16,16
Controle	OVX	12,00
Controle	OVX	8,37
Controle	OVX	9,14
Controle	OVX	10,54
Controle	OVX	5,10
Controle	OVX	7,17
Controle	OVX	22,57
Controle	OVX	5,35
Controle	OVX	11,47
Controle	OVX	7,33
Controle	Sham	23,53
Controle	Sham	13,27
Controle	Sham	3,50
Controle	Sham	12,48
Controle	Sham	6,16
Controle	Sham	11,14
Controle	Sham	3,24
Controle	Sham	8,95
Controle	Sham	4,76
Controle	Sham	2,81
Controle	Sham	0,78
Controle	Sham	14,10
Controle	Sham	17,19
Controle	Sham	10,71

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	Propionato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	Sham	17,86
Controle	Sham	6,54
PBY	OVX	7,50
PBY	OVX	8,26
PBY	OVX	22,97
PBY	OVX	13,75
PBY	OVX	12,19
PBY	OVX	14,56
PBY	OVX	5,01
PBY	OVX	20,70
PBY	OVX	12,00
PBY	OVX	18,45
PBY	OVX	8,78
PBY	OVX	7,89
PBY	OVX	7,52
PBY	OVX	21,70
PBY	OVX	14,61
PBY	OVX	8,47
PBY	Sham	5,74
PBY	Sham	8,98
PBY	Sham	28,27
PBY	Sham	44,73
PBY	Sham	2,33
PBY	Sham	16,70
PBY	Sham	16,81
PBY	Sham	7,56
PBY	Sham	16,59
PBY	Sham	20,21
PBY	Sham	22,06
PBY	Sham	3,09
PBY	Sham	20,89
PBY	Sham	11,82
PBY	Sham	2,86
PBY	Sham	9,00

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro F. Dados da concentração de Butirato por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Dieta	Cirurgia	Butirato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	OVX	36,65
Controle	OVX	33,04
Controle	OVX	16,99
Controle	OVX	22,93
Controle	OVX	12,42
Controle	OVX	32,02
Controle	OVX	30,40
Controle	OVX	24,00
Controle	OVX	18,36
Controle	OVX	22,84
Controle	OVX	11,05
Controle	OVX	18,69
Controle	OVX	44,53
Controle	OVX	13,36
Controle	OVX	23,36
Controle	OVX	15,85
Controle	Sham	60,84
Controle	Sham	25,28
Controle	Sham	7,58
Controle	Sham	23,09
Controle	Sham	16,71
Controle	Sham	23,81
Controle	Sham	6,34
Controle	Sham	19,06
Controle	Sham	11,33
Controle	Sham	5,25
Controle	Sham	4,91
Controle	Sham	29,63
Controle	Sham	35,38
Controle	Sham	21,61
Controle	Sham	32,43
Controle	Sham	14,36
PBY	OVX	16,24
PBY	OVX	15,66
PBY	OVX	46,44
PBY	OVX	28,74
PBY	OVX	23,34
PBY	OVX	26,02
PBY	OVX	1,39
PBY	OVX	47,13
PBY	OVX	41,75

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	Butirato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
PBY	OVX	34,36
PBY	OVX	23,23
PBY	OVX	27,70
PBY	OVX	16,13
PBY	OVX	36,02
PBY	OVX	31,25
PBY	OVX	13,35
PBY	Sham	19,73
PBY	Sham	18,65
PBY	Sham	63,70
PBY	Sham	44,85
PBY	Sham	10,63
PBY	Sham	30,43
PBY	Sham	33,91
PBY	Sham	21,29
PBY	Sham	33,85
PBY	Sham	44,25
PBY	Sham	46,72
PBY	Sham	6,53
PBY	Sham	42,60
PBY	Sham	24,57
PBY	Sham	6,61
PBY	Sham	20,52

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro G. Dados da concentração de Lactato por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Dieta	Cirurgia	Lactato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	OVX	2,05
Controle	OVX	1,68
Controle	OVX	1,57
Controle	OVX	1,07
Controle	OVX	1,21
Controle	OVX	1,63
Controle	OVX	1,25
Controle	OVX	0,58
Controle	OVX	1,14
Controle	OVX	1,35
Controle	OVX	0,79
Controle	OVX	0,88
Controle	OVX	2,29

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	Lactato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
Controle	OVX	0,61
Controle	OVX	0,54
Controle	OVX	0,58
Controle	Sham	1,74
Controle	Sham	1,38
Controle	Sham	0,76
Controle	Sham	1,15
Controle	Sham	1,13
Controle	Sham	1,39
Controle	Sham	0,38
Controle	Sham	1,08
Controle	Sham	0,82
Controle	Sham	0,67
Controle	Sham	1,01
Controle	Sham	1,84
Controle	Sham	2,25
Controle	Sham	0,97
Controle	Sham	1,847
Controle	Sham	1,16
PBY	OVX	1,55
PBY	OVX	1,25
PBY	OVX	4,20
PBY	OVX	2,59
PBY	OVX	1,69
PBY	OVX	1,82
PBY	OVX	0,49
PBY	OVX	1,51
PBY	OVX	2,14
PBY	OVX	2,19
PBY	OVX	1,81
PBY	OVX	1,28
PBY	OVX	2,04
PBY	OVX	3,13
PBY	OVX	3,21
PBY	OVX	1,13
PBY	Sham	1,73
PBY	Sham	1,90
PBY	Sham	5,49
PBY	Sham	3,12
PBY	Sham	2,03
PBY	Sham	2,19
PBY	Sham	2,38
PBY	Sham	1,66

Continuação...		
Dieta	Cirurgia	Lactato ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
PBY	Sham	1,70
PBY	Sham	2,39
PBY	Sham	2,56
PBY	Sham	0,71
PBY	Sham	2,32
PBY	Sham	1,73
PBY	Sham	0,36
PBY	Sham	2,06

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro H. Dados de cálcio ingerido, cálcio fecal e cálcio urinário por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Grupo	Cirurgia	CaI	CaF	CaU
Controle	OVX	115,81	32,96	30,98
Controle	OVX	114,70	18,11	24,40
Controle	OVX	118,33	27,42	31,82
Controle	OVX	107,30	26,22	41,70
Controle	OVX	121,92	22,83	37,58
Controle	OVX	99,97	29,49	4,03
Controle	OVX	140,12	25,71	40,68
Controle	OVX	101,13	29,46	11,00
Controle	OVX	99,80	28,07	12,91
Controle	OVX	92,22	35,24	11,68
Controle	OVX	122,48	28,77	8,69
Controle	OVX	118,80	28,37	26,01
Controle	OVX	111,70	27,15	39,58
Controle	OVX	96,85	39,84	10,05
Controle	OVX	90,21	19,73	38,95
Controle	OVX	87,17	34,67	13,09
Controle	Sham	108,38	24,10	2,57
Controle	Sham	117,43	14,86	29,25
Controle	Sham	125,10	24,15	30,67
Controle	Sham	135,01	18,33	13,21
Controle	Sham	105,38	18,10	29,31
Controle	Sham	99,26	38,53	15,62
Controle	Sham	96,43	25,13	39,13
Controle	Sham	62,32	23,89	3,61
Controle	Sham	118,46	30,08	30,73
Controle	Sham	110,33	22,53	12,64
Controle	Sham	122,23	36,26	22,92
Controle	Sham	119,27	33,75	36,94
Controle	Sham	100,85	23,08	12,51

Continuação...				
Grupo	Cirurgia	CaI	CaF	CaU
Controle	Sham	93,95	24,59	13,77
Controle	Sham	98,43	37,88	35,50
Controle	Sham	95,30	44,95	20,03
PBY	OVX	111,35	28,09	26,02
PBY	OVX	112,52	24,99	21,69
PBY	OVX	106,20	19,44	12,74
PBY	OVX	108,25	17,64	15,41
PBY	OVX	103,85	26,23	18,46
PBY	OVX	112,15	32,41	15,04
PBY	OVX	107,00	32,41	25,40
PBY	OVX	115,93	24,88	32,58
PBY	OVX	114,30	15,82	26,05
PBY	OVX	103,40	16,74	22,94
PBY	OVX	111,90	19,50	0,37
PBY	OVX	110,75	22,92	37,41
PBY	OVX	112,52	33,87	33,37
PBY	OVX	107,05	15,14	25,24
PBY	OVX	109,66	15,87	25,99
PBY	OVX	110,20	8,62	38,51
PBY	Sham	111,97	24,84	0,05
PBY	Sham	108,20	15,24	28,16
PBY	Sham	114,51	39,13	18,17
PBY	Sham	109,00	27,27	2,75
PBY	Sham	105,00	25,01	26,27
PBY	Sham	111,00	18,63	21,07
PBY	Sham	110,00	20,99	19,57
PBY	Sham	101,50	5,95	17,67
PBY	Sham	107,68	17,57	11,35
PBY	Sham	103,50	17,54	5,33
PBY	Sham	107,50	20,56	20,98
PBY	Sham	112,00	29,85	26,10
PBY	Sham	112,40	18,97	10,67
PBY	Sham	95,52	24,75	6,46
PBY	Sham	108,10	18,88	25,23
PBY	Sham	113,50	23,70	15,40

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro I. Dados relacionados ao balanço de cálcio por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Grupo	Cirurgia	AAF (mg)	AA (%)	BM (mg)	RM (%)
Controle	OVX	82,84	71,53	51,86	44,78
Controle	OVX	96,58	84,20	72,12	62,87
Controle	OVX	90,91	76,82	59,08	49,93
Controle	OVX	81,07	75,56	39,37	36,69
Controle	OVX	99,09	81,27	61,50	50,44
Controle	OVX	70,48	70,50	66,44	66,46
Controle	OVX	114,40	81,64	73,72	52,61
Controle	OVX	71,67	70,87	60,66	59,98
Controle	OVX	71,72	71,87	58,80	58,92
Controle	OVX	56,97	61,77	45,28	49,10
Controle	OVX	93,71	76,50	85,01	69,40
Controle	OVX	90,42	76,11	64,41	54,21
Controle	OVX	84,54	75,69	44,96	40,25
Controle	OVX	57,001	58,85	46,94	48,47
Controle	OVX	70,47	78,12	31,52	34,94
Controle	OVX	52,50	60,22	39,40	45,20
Controle	Sham	84,28	77,75	81,70	75,38
Controle	Sham	102,57	87,34	73,31	62,43
Controle	Sham	100,94	80,69	70,27	56,176
Controle	Sham	116,67	86,41	103,46	76,63
Controle	Sham	87,28	82,81	57,96	55,00
Controle	Sham	60,73	61,18	45,10	45,44
Controle	Sham	71,30	73,93	32,17	33,36
Controle	Sham	38,42	61,65	34,80	55,85
Controle	Sham	88,37	74,60	57,64	48,65
Controle	Sham	87,80	79,57	75,15	68,11
Controle	Sham	85,96	70,32	63,04	51,57
Controle	Sham	85,52	71,70	48,58	40,73
Controle	Sham	77,76	77,10	65,24	64,69
Controle	Sham	69,35	73,81	55,57	59,15
Controle	Sham	60,55	61,51	25,05	25,44
Controle	Sham	50,34	52,82	30,30	31,80
PBY	OVX	83,25	74,76	57,22	51,39
PBY	OVX	87,53	77,78	65,84	58,51
PBY	OVX	86,75	81,69	74,01	69,69
PBY	OVX	90,60	83,69	75,19	69,46
PBY	OVX	77,61	74,74	59,15	56,96
PBY	OVX	79,73	71,09	64,69	57,68
PBY	OVX	74,58	69,70	49,17	45,96
PBY	OVX	91,05	78,53	58,47	50,43
PBY	OVX	98,47	86,15	72,42	63,36
PBY	OVX	86,65	83,80	63,71	61,62

Continuação...					
Grupo	Cirurgia	AAF (mg)	AA (%)	BM (mg)	RM (%)
PBY	OVX	92,39	82,57	92,02	82,23
PBY	OVX	87,82	79,29	50,40	45,51
PBY	OVX	78,64	69,89	45,27	40,23
PBY	OVX	91,90	85,85	66,66	62,27
PBY	OVX	93,78	85,52	67,79	61,81
PBY	OVX	101,57	92,17	63,05	57,21
PBY	Sham	87,13	77,81	87,07	77,76
PBY	Sham	92,95	85,91	64,79	59,88
PBY	Sham	75,37	65,82	57,20	49,95
PBY	Sham	81,72	74,97	78,96	72,44
PBY	Sham	79,98	76,17	53,71	51,15
PBY	Sham	92,36	83,20	71,28	64,22
PBY	Sham	89,00	80,91	69,42	63,11
PBY	Sham	95,54	94,13	77,86	76,71
PBY	Sham	90,11	83,67	78,75	73,13
PBY	Sham	85,95	83,04	80,62	77,89
PBY	Sham	86,93	80,86	65,95	61,35
PBY	Sham	82,14	73,34	56,03	50,03
PBY	Sham	93,42	83,12	82,75	73,62
PBY	Sham	70,77	74,08	64,30	67,32
PBY	Sham	89,21	82,52	63,98	59,18
PBY	Sham	89,79	79,11	74,38	65,54

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro J. Conteúdo mineral ósseo por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Grupo	Cirurgia	Ca (%)	Mg (%)	P (%)
Controle	OVX	19,99	0,20	9,25
Controle	OVX	22,58	0,20	9,53
Controle	OVX	20,28	0,20	9,53
Controle	OVX	18,83	0,18	7,81
Controle	OVX	21,28	0,21	8,99
Controle	OVX	21,72	0,19	9,81
Controle	OVX	25,67	0,22	8,03
Controle	OVX	28,45	0,24	10,74
Controle	OVX	13,46	0,16	6,61
Controle	OVX	16,07	0,19	7,81
Controle	OVX	20,04	0,20	8,49
Controle	OVX	23,07	0,21	10,74
Controle	OVX	22,46	0,21	8,49
Controle	OVX	26,15	0,21	8,99
Controle	OVX	24,43	0,20	10,74
Controle	OVX	28,23	0,24	11,08
Controle	Sham	26,92	0,23	11,81
Controle	Sham	3,30	0,049	2,77
Controle	Sham	20,91	0,19	12,21
Controle	Sham	17,72	0,17	6,99
Controle	Sham	28,53	0,21	9,53
Controle	Sham	28,20	0,23	10,74
Controle	Sham	19,37	0,19	7,81
Controle	Sham	25,00	0,23	8,26
Controle	Sham	23,33	0,21	9,25
Controle	Sham	21,18	0,18	8,49
Controle	Sham	28,74	0,24	11,08
Controle	Sham	28,84	0,26	9,81
Controle	Sham	17,81	0,17	7,59
Controle	Sham	23,89	0,20	8,99
Controle	Sham	19,55	0,18	8,74
Controle	Sham	28,09	0,26	12,21
PBY	OVX	-	-	-
PBY	OVX	25,21	0,23	10,74
PBY	OVX	18,58	0,20	7,81
PBY	OVX	28,80	0,24	9,81
PBY	OVX	28,36	0,25	8,99
PBY	OVX	27,39	0,25	4,49
PBY	OVX	22,23	0,20	8,03
PBY	OVX	26,75	0,25	9,53
PBY	OVX	21,44	0,23	10,11
PBY	OVX	29,09	0,25	10,11

Continuação...				
Grupo	Cirurgia	Ca (%)	Mg (%)	P (%)
PBY	OVX	23,30	0,21	9,81
PBY	OVX	24,68	0,22	9,53
PBY	OVX	24,04	0,21	11,08
PBY	OVX	27,67	0,23	10,11
PBY	OVX	20,00	0,18	8,03
PBY	OVX	22,37	0,20	8,49
PBY	Sham	20,51	0,19	7,81
PBY	Sham	27,19	0,22	10,74
PBY	Sham	26,51	0,23	9,25
PBY	Sham	21,03	0,19	8,49
PBY	Sham	28,79	0,22	10,11
PBY	Sham	19,70	0,19	8,03
PBY	Sham	20,58	0,20	9,25
PBY	Sham	23,54	0,22	8,74
PBY	Sham	20,04	0,19	9,81
PBY	Sham	19,74	0,19	9,81
PBY	Sham	25,73	0,24	9,81
PBY	Sham	24,62	0,22	9,81
PBY	Sham	25,66	0,23	9,81
PBY	Sham	23,48	0,23	9,53
PBY	Sham	21,98	0,20	9,53
PBY	Sham	26,93	0,22	9,81

PBY: Produto à base de yacon; Ca: cálcio; Mg: magnésio; P: fósforo; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro K. Níveis séricos dos marcadores de formação e reabsorção óssea por grupo e tipo de cirurgia (n=10)

Grupo	Cirurgia	FA (U/L)	NTX ng/mL
Controle	Sham	39,00	64,84
Controle	Sham	43,00	36,36
Controle	Sham	49,00	40,14
Controle	Sham	21,00	29,71
Controle	Sham	30,00	50,98
Controle	Sham	23,00	22,76
Controle	Sham	34,00	46,51
Controle	Sham	39,00	29,90
Controle	Sham	28,00	28,21
Controle	Sham	49,00	33,48
Controle	OVX	25,00	68,18
Controle	OVX	39,00	60,72
Controle	OVX	35,00	71,12
Controle	OVX	26,00	35,85
Controle	OVX	25,00	52,59
Controle	OVX	33,00	14,38
Controle	OVX	13,00	58,30
Controle	OVX	25,00	40,14
Controle	OVX	34,00	52,59
Controle	OVX	34,00	35,85
PBY	Sham	53,00	30,10
PBY	Sham	47,00	53,84
PBY	Sham	25,00	39,57
PBY	Sham	42,00	27,16
PBY	Sham	64,00	20,17
PBY	Sham	35,00	39,01
PBY	Sham	36,00	28,95
PBY	Sham	71,00	25,06
PBY	Sham	64,00	24,60
PBY	OVX	55,00	53,42
PBY	OVX	65,00	11,69
PBY	OVX	41,00	25,06
PBY	OVX	70,00	37,92
PBY	OVX	58,00	24,60
PBY	OVX	94,00	34,64
PBY	OVX	108,00	46,55
PBY	OVX	96,00	46,51
PBY	OVX	46,00	31,52
PBY	OVX	76,00	48,68

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário). FA: Fosfatase Alcalina; NTX: Telopectídeo Aminoterminal do colágeno tipo I

Quadro L. Conteúdo mineral ósseo (CMO), área do fêmur e densidade mineral óssea (DMO) por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Grupo	Cirurgia	CMO (g)	Área (cm²)	DMO (g/cm²)
Controle	OVX	0,3280	1,3110	0,2500
Controle	OVX	0,3580	1,5510	0,2310
Controle	OVX	0,3790	1,6010	0,2370
Controle	OVX	0,3000	1,3920	0,2150
Controle	OVX	0,2870	1,3640	0,1370
Controle	OVX	0,2080	1,2650	0,1640
Controle	OVX	0,3070	1,3600	0,2260
Controle	OVX	0,3750	1,4600	0,2570
Controle	OVX	0,2940	1,2080	0,2430
Controle	OVX	0,2400	1,3140	0,1830
Controle	OVX	0,3690	1,5740	0,2350
Controle	OVX	0,3010	1,4150	0,2120
Controle	OVX	0,3610	1,6080	0,2250
Controle	OVX	0,2070	1,4000	0,1480
Controle	OVX	0,3580	1,7450	0,2050
Controle	OVX	0,3430	1,4440	0,2380
Controle	Sham	0,3630	1,4530	0,2500
Controle	Sham	0,3720	1,5580	0,2390
Controle	Sham	0,3820	1,6330	0,2340
Controle	Sham	0,2900	1,3120	0,2210
Controle	Sham	0,3920	1,6690	0,2350
Controle	Sham	0,2200	1,2210	0,1810
Controle	Sham	0,3320	1,5230	0,2180
Controle	Sham	0,3250	1,3250	0,2450
Controle	Sham	0,3000	1,2680	0,2370
Controle	Sham	0,3240	1,3430	0,2410
Controle	Sham	0,4030	1,7160	0,2350
Controle	Sham	0,3410	1,3670	0,2500
Controle	Sham	0,2210	1,1940	0,1850
Controle	Sham	0,2660	1,3220	0,2010
Controle	Sham	0,3280	1,3310	0,2470
Controle	Sham	0,3920	1,3600	0,2890
PBY	OVX	0,3460	1,7470	0,1990
PBY	OVX	0,3550	1,4200	0,2500
PBY	OVX	0,1960	1,3210	0,1480
PBY	OVX	0,2140	1,3200	0,1620
PBY	OVX	0,3540	1,6480	0,2150
PBY	OVX	0,3170	1,3500	0,2350
PBY	OVX	0,2790	1,3150	0,2120
PBY	OVX	0,3220	1,3950	0,2310
PBY	OVX	0,3190	1,5690	0,2030
PBY	OVX	0,3100	1,4010	0,2210

Continuação...				
Grupo	Cirurgia	CMO (g)	Área (cm ²)	DMO (g/cm ²)
PBY	OVX	0,2880	1,5000	0,1920
PBY	OVX	0,4010	1,7900	0,2240
PBY	OVX	0,4190	1,6090	0,2600
PBY	OVX	0,3070	1,4330	0,2150
PBY	OVX	0,3900	1,7150	0,2280
PBY	OVX	0,3260	1,6620	0,1960
PBY	Sham	0,3050	1,2660	0,2410
PBY	Sham	0,3940	1,6430	0,2400
PBY	Sham	0,3460	1,4180	0,2440
PBY	Sham	0,3060	1,2810	0,2390
PBY	Sham	0,3550	1,2910	0,2750
PBY	Sham	0,2210	1,3260	0,1670
PBY	Sham	0,3590	1,4700	0,2440
PBY	Sham	0,2260	1,3360	0,1690
PBY	Sham	0,2940	1,4090	0,2090
PBY	Sham	0,3400	1,2770	0,2660
PBY	Sham	0,3940	1,5860	0,2480
PBY	Sham	0,3270	1,3540	0,2410
PBY	Sham	0,2270	1,3340	0,1700
PBY	Sham	0,2520	1,2750	0,1980
PBY	Sham	0,3000	1,5060	0,1990
PBY	Sham	0,2130	1,2940	0,1640

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro M. Força máxima, rigidez e tenacidade da cabeça do fêmur por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Grupo	Cirurgia	Força máxima (N)	Rigidez (Mpa)	Tenacidade (mJ)
Controle	OVX	130,80	143,99	70,50
Controle	OVX	131,69	312,21	54,70
Controle	OVX	133,55	271,69	61,40
Controle	OVX	96,00	265,64	37,10
Controle	OVX	129,07	368,66	37,07
Controle	OVX	154,53	265,90	62,00
Controle	OVX	116,47	143,69	75,90
Controle	OVX	80,40	65,506	52,30
Controle	OVX	130,41	136,72	83,90
Controle	OVX	107,39	238,75	43,70
Controle	OVX	139,62	225,00	103,00
Controle	OVX	33,77	26,436	31,30
Controle	OVX	138,61	185,81	61,10
Controle	OVX	148,51	120,72	101,00
Controle	OVX	90,25	192,58	31,10
Controle	OVX	96,52	161,48	66,90
Controle	Sham	132,21	207,44	59,50
Controle	Sham	136,30	285,58	41,20
Controle	Sham	101,50	119,39	59,20
Controle	Sham	169,69	414,2	91,60
Controle	Sham	115,51	213,93	40,50
Controle	Sham	109,37	259,92	25,90
Controle	Sham	102,59	238,05	36,20
Controle	Sham	136,23	221,15	48,80
Controle	Sham	122,42	317,56	35,70
Controle	Sham	56,35	398,69	6,73
Controle	Sham	165,66	442,91	79,70
Controle	Sham	122,93	185,86	51,70
Controle	Sham	146,85	197,71	82,90
Controle	Sham	192,84	224,43	88,00
Controle	Sham	135,15	323,92	47,30
Controle	Sham	132,65	201,08	99,10
PBY	OVX	127,6	215,86	77,40
PBY	OVX	151,97	206,49	78,90
PBY	OVX	121,72	84,90	110,00
PBY	OVX	108,73	258,98	35,10
PBY	OVX	107,26	222,02	48,40
PBY	OVX	148,00	255,02	129,00
PBY	OVX	129,52	293,61	62,90
PBY	OVX	108,92	255,59	42,00
PBY	OVX	110,59	303,34	43,60
PBY	OVX	137,39	243,16	95,30

Continuação...				
Grupo	Cirurgia	Força máxima (N)	Rigidez (Mpa)	Tenacidade (mJ)
PBY	OVX	128,11	163,70	62,60
PBY	OVX	137,13	295,34	39,50
PBY	OVX	142,76	340,81	92,7
PBY	OVX	121,52	332,48	41,00
PBY	OVX	116,22	205,11	53,80
PBY	OVX	111,99	190,09	76,80
PBY	Sham	119,29	266,50	39,00
PBY	Sham	143,08	222,43	75,00
PBY	Sham	103,74	222,26	40,00
PBY	Sham	176,02	233,57	92,70
PBY	Sham	124,27	207,56	46,70
PBY	Sham	103,23	274,06	38,80
PBY	Sham	122,04	333,63	65,10
PBY	Sham	150,5	287,95	48,60
PBY	Sham	101,06	258,28	42,80
PBY	Sham	165,53	283,77	52,20
PBY	Sham	123,19	191,20	63,10
PBY	Sham	140,14	211,86	76,50
PBY	Sham	70,93	198,69	24,40
PBY	Sham	140,39	121,50	92,50
PBY	Sham	108,03	237,19	39,30
PBY	Sham	109,88	261,76	53,00

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário).

Quadro N. Força máxima, rigidez e módulo de elasticidade da diáfise do fêmur por grupo e tipo de cirurgia (n=16)

Grupo	Cirurgia	Fmáx(N)	Rigidez (Mpa)	Módulo de Elasticidade (Mpa)
Controle	OVX	1063,97	4944,40	4968,60
Controle	OVX	467,42	1572,50	2010,10
Controle	OVX	640,81	x	x
Controle	OVX	447,66	805,68	947,18
Controle	OVX	822,97	5006,20	5801,40
Controle	OVX	381,01	1296,10	1353,40
Controle	OVX	712,32	1963,50	2796,20
Controle	OVX	301,38	891,54	984,37
Controle	OVX	344,30	3257,20	1996,60
Controle	OVX	502,21	1697,80	2034,80
Controle	OVX	783,96	2382,60	2420,10
Controle	OVX	280,40	x	1755,10
Controle	OVX	502,85	1918,00	2583,20
Controle	OVX	628,28	2521,20	2147,80
Controle	OVX	451,24	1147,70	1432,70
Controle	OVX	618,30	1778,30	3587,00
Controle	Sham	881,30	3065,50	3203,10
Controle	Sham	822,27	4620,30	4642,70
Controle	Sham	449,38	3248,10	2751,20
Controle	Sham	780,37	3003,00	2983,80
Controle	Sham	701,13	1419,30	1578,40
Controle	Sham	804,36	2180,10	2790,50
Controle	Sham	428,21	1735,40	2014,40
Controle	Sham	661,03	1630,10	1715,80
Controle	Sham	275,09	1516,20	2060,70
Controle	Sham	704,45	1693,60	1995,80
Controle	Sham	868,96	4301,20	5046,60
Controle	Sham	664,35	1782,00	2699,70
Controle	Sham	475,35	x	x
Controle	Sham	533,30	1114,70	1210,80
Controle	Sham	596,43	1059,30	1763,30
Controle	Sham	629,11	1701,40	1974,40
PBY	OVX	591,69	2121,90	2790,40
PBY	OVX	807,69	3904,00	5070,60
PBY	OVX	528,31	933,23	1377,20
PBY	OVX	641,45	1291,70	2323,80
PBY	OVX	504,77	1664,10	1908,10
PBY	OVX	713,92	2271,10	2413,50
PBY	OVX	756,77	3033,00	4382,40
PBY	OVX	621,88	1824,10	1835,10
PBY	OVX	540,59	1552,30	1009,00
PBY	OVX	790,54	4493,80	4425,30

Continuação...				
Grupo	Cirurgia	Fmáx(N)	Rigidez (Mpa)	Módulo de Elasticidade (Mpa)
PBY	OVX	391,56	3120,90	2453,30
PBY	OVX	811,27	1768,50	1903,20
PBY	OVX	848,49	2831,90	4005,20
PBY	OVX	485,84	2091,80	2448,00
PBY	OVX	445,42	1353,90	1294,10
PBY	Sham	598,92	3266,20	4020,40
PBY	Sham	720,32	2576,70	2923,20
PBY	Sham	527,60	2132,60	2229,40
PBY	Sham	653,35	2639,10	3358,30
PBY	Sham	601,54	2892,30	5450,60
PBY	Sham	518,33	1175,40	1566,80
PBY	Sham	908,93	2800,10	4037,70
PBY	Sham	737,33	1352,10	1761,00
PBY	Sham	827,70	4286,00	4443,80
PBY	Sham	419,70	3407,30	3136,30
PBY	Sham	312,89	1442,90	1393,30
PBY	Sham	684,11	1955,00	2075,40
PBY	Sham	594,38	1656,60	1653,70
PBY	Sham	467,16	1102,70	1571,90
PBY	Sham	458,78	1237,90	1549,90
PBY	Sham	601,09	1314,00	1627,40

PBY: Produto à base de yacon; OVX: ratas ovariectomizadas (sem ovário); Sham: (ratas celiotomizadas, com ovário); x: sem condição de cálculo.