

Produção de bebidas vegetais carreadoras de micro-organismos probióticos e com propriedades antioxidantes e hipoglicemiantes

Palavras-Chave: grãos germinados, fermentação, compostos bioativos.

Autores(as):

Laura Gabrielle de Almeida Cruz*, Vivian Tomasco Andrade, André Ohara [FEA – UNICAMP]

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador) [FEA - UNICAMP]

INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização humana, a fermentação tem sido utilizada como um método econômico de produção e preservação de alimentos e bebidas. Dentre estes alimentos, destacam-se os grãos, que são importantes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras. Apesar de possuírem qualidades nutricionais e sensoriais inferiores ao do leite e derivados, os grãos de cereais e leguminosas, quando fermentados, apresentam incrementos significativos em diversas componentes como: concentração de ferro, zinco, cálcio, magnésio e proteínas. Além disso, vida de prateleira, textura, sabor e aroma do produto final também são melhorados com o processo fermentativo (BLANDINO; AL-ASEERI; PANDIELLA; CANTERO et al., 2003).

A germinação, por sua vez, é um processo biológico natural que promove diversas transformações bioquímicas e fisiológicas nos grãos, podendo mudar positivamente a composição nutricional dos grãos, reduzir o teor de compostos antinutricionais e melhorar propriedades biológicas, como a atividade antioxidante (RASERA & DE CASTRO, 2020).

E se associássemos estes dois processos (fermentação e germinação)? Estudos relatam que bebidas produzidas a partir de grãos germinados demonstraram resultados promissores relacionados ao aumento de propriedades funcionais tais como: disponibilidade de polifenóis, produção de peptídeos com atividade antioxidante, aumento da população de micro-organismos probióticos e efeitos antiproliferativos contra células de câncer de cólon.

Diante de todo esse potencial, o objetivo desse trabalho foi avaliar as propriedades antioxidantes e hipoglicemiantes de bebidas fermentadas formuladas a partir de grãos germinados e não germinados utilizando uma linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*), uma levedura probiótica.

METODOLOGIA

Os grãos utilizados para a formulação das bebidas (lentilha, arroz integral e sorgo) foram adquiridos no comércio local de Campinas, São Paulo. Os grãos foram higienizados, fracionados e uma parte submetida à germinação durante 48 h a 25°C na ausência de luz. A partir dos grãos germinados e não germinados foram produzidas farinhas para aplicação como substrato fermentativo.

A levedura *S. boulardii* foi adquirida na forma liofilizada e posteriormente ativada em caldo YEPD a 30°C por três gerações consecutivas (Chaiyasut et al., 2017).

As bebidas foram preparadas utilizando as farinhas dos grãos (germinados ou não) individualmente e em combinações binárias/ternárias (Tabela 1).

Tabela 1. Formulações contendo as farinhas de lentilha, arroz integral e sorgo para a elaboração das bebidas vegetais.

Ensaio	Lentilha (g)	Arroz Integral (g)	Sorgo (g)
1	5	0	0
2	0	5	0
3	0	0	5
4	2,5	2,5	0
5	2,5	0	2,5
6	0	2,5	2,5
7	3,33	0,83	0,84
8	0,83	3,33	0,84
9	0,83	0,84	3,33
10	1,67	1,67	1,66

Para o processo fermentativo, utilizou-se frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo as diferentes composições de meio (5 g) e água destilada (100 mL). As amostras foram esterilizadas (121°C por 15 min) e após resfriamento, os meios foram inoculados com 1% (v/v) da cultura de *S. boulardii* (~10⁹ células/mL) já reativada. O processo fermentativo ocorreu por 24 h à temperatura de 30°C com agitação de 100 rpm. As amostras controle foram preparadas da mesma forma descrita anteriormente, contudo sem a adição do inóculo. A contagem de células viáveis em placa foi monitorada e expressa em UFC mL⁻¹.

A atividade antioxidante das bebidas foi determinada pelos métodos ABTS (Al-duais, 2009), DPPH (Al-duais, 2009) e FRAP (Benezie e Strain, 1996) e os resultados foram expressos em µmol Trolox mL⁻¹. As propriedades hipoglicemiantes foram determinadas por meio da capacidade de inibição da enzima α-amilase (Dra et al., 2019).

Os resultados finais foram expressos como média (n = 3) ± desvio padrão e foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey utilizando o software Minitab® 19 de Minitab Inc. (Pensilvânia, EUA). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando os valores de *p* foram inferiores a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bebidas vegetais foram formuladas e inoculadas com *S. boulardii* e após 24 h de fermentação, as amostras foram submetidas à contagem de células viáveis. Os resultados obtidos para as bebidas produzidas utilizando as diferentes composições de grãos germinados e/ou não germinados estão dispostos na Tabela 2.

Os resultados obtidos para os ensaios conduzidos com grãos germinados mostraram maior crescimento da levedura no ensaio 4 (lentilha + arroz em iguais proporções), seguido do ensaio 10; enquanto o menor desenvolvimento foi detectado no ensaio 6 (Tabela 2). Todas as contagens nesse grupo foram da ordem de 10⁹ UFC mL⁻¹ ou superiores. Para as bebidas obtidas utilizando os grãos não germinados, o ensaio 4 também permitiu o maior crescimento. Os ensaios 1, 2 e 10 atingiram contagens de células viáveis da ordem de 10⁹ UFC mL⁻¹, enquanto, nas demais formulações, as contagens ficaram na ordem de 10⁸ UFC mL⁻¹ (Tabela 2).

As propriedades antioxidantes das bebidas produzidas foram analisadas pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 2. Contagens de células viáveis de *S. boulardii* determinadas para as diferentes formulações de bebidas vegetais compostas por grãos não germinados e germinados de lentilha, arroz integral e sorgo presentes de forma isolada (ensaios 1 a 3), misturas binárias (ensaios 4 a 6) e ternárias (ensaios 7 a 10).

Ensaios	Grãos não germinados (NGF) (UFC mL ⁻¹)	Grãos germinados (GF) (UFC mL ⁻¹)
1	1,53.10 ⁹	6,67.10 ⁹
2	5,67.10 ⁹	1,40.10 ¹⁰
3	2,33.10 ⁸	7,00.10 ¹⁰
4	1,27.10 ¹⁰	2,33.10 ¹²
5	3,00.10 ⁸	4,33.10 ¹⁰
6	5,67.10 ⁸	1,07.10 ⁹
7	5,67.10 ⁸	3,67.10 ⁹
8	4,67.10 ⁸	5,33.10 ¹⁰
9	3,33.10 ⁸	1,33.10 ¹⁰
10	5,00.10 ⁹	2,67.10 ¹¹

As diferentes composições de bebidas apresentaram propriedades antioxidantes distintas como resultado da germinação e do processo fermentativo utilizando *S. boulardii*. A determinação das propriedades antioxidantes das bebidas resultou em valores variando de 639,30 a 1396,72 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ para o método ABTS, de 181,92 a 488,10 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ para o método DPPH e de 60,90 a 567,20 $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ para o método FRAP. Considerando a análise comparativa entre os grupos NGC com NGF (grãos não germinados) e GC com GF (grãos germinados) (Tabela 3), foi possível detectar o efeito positivo da fermentação com *S. boulardii* sobre as propriedades antioxidantes das bebidas.

Para atividade antioxidante das bebidas produzidas com os grãos não germinados (NGC e NGF) medida pelo método ABTS, os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 1 (composto somente por lentilha) e 7 (composto pela mistura ternária de lentilha, arroz e sorgo, com a lentilha em maior proporção). Para estes grupos de amostras (NGC e NGF), a fermentação com *S. boulardii*, na maior parte dos casos, resultou em aumentos consideráveis da atividade antioxidante quando comparadas as mesmas formulações antes e após a fermentação. De forma similar, os melhores resultados para o método ABTS para as bebidas produzidas a partir dos grãos germinados (GC e GF) foram obtidos no ensaio 1, havendo também aumento expressivo da atividade após a fermentação para a maior parte dos ensaios (Tabela 3).

Os efeitos positivos da fermentação considerando uma análise comparativa entre os grupos NGC com NGF e GC com GF, também foram observados para a maior parte dos ensaios quando as propriedades antioxidantes foram medidas pelos métodos DPPH e FRAP (Tabela 3).

Os resultados obtidos para as propriedades hipoglicemiantes (atividade relativa da enzima α -amilase) estão apresentados na Tabela 4. Diante dos resultados obtidos, foi possível constatar que as propriedades hipoglicemiantes das bebidas vegetais produzidas a partir dos grãos não germinados (grupos NGC e NGF) foram melhoradas após o processo fermentativo, atingindo atividades relativas de até -76%, o que indica inibição (ensaio 2, grupo NGF) (Tabela 4). Ao contrário das amostras não germinadas, as bebidas produzidas a partir dos grãos germinados (grupos NGC e NGF) não apresentaram capacidade de inibição da enzima α -amilase, resultando em valores positivos de atividade relativa e ativação enzimática (Tabela 4).

Magro et al. (2019) mostraram que extratos obtidos a partir de lentilhas fermentadas por *A. oryzae* e por *A. niger* aumentaram em 107 e 81%, respectivamente, as suas propriedades antioxidantes (FRAP) em comparação com as lentilhas não fermentadas. Os autores ainda reportam que dentre os efeitos da fermentação sobre substratos vegetais, a liberação de compostos fenólicos conjugados na parede celular contribui para o aumento expressivo da atividade antioxidante dos produtos fermentados.

Tabela 3. Atividade antioxidante de bebidas não fermentadas e fermentadas obtidas a partir de grãos não germinados e germinados medida pelo método ABTS, DPPH e FRAP.

Ensaio	Atividade antioxidante – ABTS ($\mu\text{mol TE mL}^{-1}$)			
	NGC	NGF	GC	GF
1	1396,72 ^a	1392,42 ^a	1171,10 ^a	1259,00 ^a
2	737,40 ^d	879,30 ^f	639,30 ^f	797,12 ^e
3	840,3 ^{cd}	961,50 ^e	1025,75 ^{abc}	1196,46 ^b
4	1180,00 ^{ab}	1286,50 ^b	691,70 ^{ef}	1109,42 ^c
5	881,30 ^{bcd}	1291,50 ^b	1050,80 ^{abc}	1226,11 ^{ab}
6	767,60 ^{cd}	935,01 ^{ef}	895,10 ^{bcd}	1087,00 ^c
7	1047,00 ^{bcd}	1332,10 ^{ab}	706,40 ^{def}	1204,26 ^b
8	859,90 ^{bcd}	1045,30 ^d	855,30 ^{cde}	1002,50 ^d
9	1090,00 ^{abc}	1093,9 ^d	1055,40 ^{ab}	1180,89 ^b
10	908,00 ^{bcd}	1189,84 ^c	1084,07 ^{ab}	1093,46 ^c

Ensaio	Atividade antioxidante – DPPH ($\mu\text{mol TE mL}^{-1}$)			
	NGC	NGF	GC	GF
1	356,60 ^b	479,34 ^a	371,37 ^{ab}	462,2 ^a
2	181,92 ^e	205,61 ^d	245,21 ^{fg}	228,10 ^e
3	291,31 ^c	279,12 ^c	338,70 ^{bc}	359,02 ^{cd}
4	359,11 ^b	470,85 ^a	364,29 ^{ef}	429,40 ^{ab}
5	380,92 ^{ab}	470,53 ^a	384,20 ^a	444,40 ^a
6	231,21 ^d	187,36 ^d	219,49 ^g	328,04 ^d
7	348,64 ^b	461,07 ^a	326,35 ^{cd}	412,46 ^{abc}
8	310,10 ^c	324,20 ^b	290,14 ^{de}	312,51 ^d
9	407,90 ^a	350,00 ^b	322,81 ^{cd}	367,62 ^{bcd}
10	354,14 ^b	488,10 ^a	337,89 ^{bc}	357,94 ^{cd}

Ensaio	Atividade antioxidante – FRAP ($\mu\text{mol TE mL}^{-1}$)			
	NGC	NGF	GC	GF
1	250,50 ^{bcd}	567,20 ^a	216,98 ^a	361,50 ^a
2	327,30 ^b	184,88 ^d	66,60 ^c	110,70 ^e
3	486,50 ^a	188,40 ^d	179,85 ^{ab}	226,88 ^{cd}
4	122,62 ^d	370,27 ^b	88,80 ^{bc}	232,02 ^{cd}
5	149,89 ^{cd}	390,50 ^b	93,30 ^{bc}	259,67 ^{bc}
6	203,50 ^{bcd}	202,30 ^d	98,50 ^{bc}	189,31 ^d
7	293,40 ^{bc}	396,52 ^b	60,90 ^c	283,54 ^b
8	229,90 ^{bcd}	224,67 ^{cd}	104,90 ^{bc}	133,23 ^e
9	174,37 ^{cd}	186,19 ^d	179,03 ^{ab}	234,70 ^{cd}
10	251,80 ^{bcd}	337,10 ^{bc}	184,14 ^{ab}	228,70 ^{cd}

NGC: amostras não fermentadas de grãos não germinados; NGF: amostras fermentadas de grãos não germinados; GC: amostras não fermentadas de grãos germinados; GF: amostras fermentadas de grãos germinados. As análises comparativas foram realizadas entre os resultados dos ensaios 1 a 10 a letras diferentes na coluna indicam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 4. Atividade hipoglicemiante expressa como atividade relativa (%) da enzima α -amilase para as bebidas não fermentadas e fermentadas obtidas a partir de grãos não germinados e germinados.

Ensaio	Atividade hipoglicemiante (atividade relativa % da enzima α -amilase)			
	NGC	NGF	GC	GF
1	11,12 ± 2,04	-2,16 ± 3,45	1,21 ± 3,73	11,42 ± 4,41
2	- 6,40 ± 6,78	-76,29 ± 8,25	9,24 ± 8,38	9,82 ± 13,81
3	-13,91 ± 9,11	-64,92 ± 13,10	21,34 ± 12,45	2,58 ± 0,91
4	9,71 ± 4,87	-46,50 ± 1,97	15,62 ± 8,96	20,94 ± 2,36
5	6,70 ± 7,43	-24,00 ± 5,03	28,71 ± 11,52	21,35 ± 3,15
6	-14,25 ± 6,23	-28,26 ± 8,64	2,62 ± 8,72	9,69 ± 12,70
7	3,62 ± 5,64	-11,21 ± 5,87	30,42 ± 3,16	14,01 ± 9,00
8	1,13 ± 5,04	3,09 ± 10,80	24,09 ± 3,72	31,81 ± 2,06
9	-7,18 ± 0,52	-17,82 ± 10,82	16,16 ± 9,77	21,11 ± 5,92
10	0,21 ± 5,22	-5,02 ± 3,61	20,37 ± 9,52	22,46 ± 2,36

NGC: amostras não fermentadas de grãos não germinados; NGF: amostras fermentadas de grãos não germinados; GC: amostras não fermentadas de grãos germinados; GF: amostras fermentadas de grãos germinados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o processo fermentativo utilizando *S. boulardii* modificaram positivamente as diferentes composições de grãos de lentilha, arroz integral e sorgo, resultando em bebidas com propriedades antioxidantes e hipoglicemiantes mais atrativas. Adicionalmente, as bebidas mostraram-se como uma excelente alternativa para veicular micro-organismos probióticos, associando uma funcionalidade adicional ao produto obtido.

BIBLIOGRAFIA

- AL-DUAIS, M. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. **European Food Research Technology**, v. 228, p. 813-821, 2009.
- BENEZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.; PANDIELLA, S.; CANTERO, D. et al. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, 36, n. 6, p. 527-543, 2003.
- CHAIYASUT, C.; PENGKUMSRI, N.; SIRILUN, S.; PEERAJAN, S.; KHONGTAN, S.; SIVAMARUTHI, B. S. Assessment of changes in the content of anthocyanins, phenolic acids, and antioxidant property of *Saccharomyces cerevisiae* mediated fermented black rice bran. **Amb Express**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- MAGRO, A. E. A.; SILVA, L. C.; RASERA, G. B.; CASTRO, R. J. S. Solid-state fermentation as an efficient strategy for the biotransformation of lentils: enhancing their antioxidant and antidiabetic potentials. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 38, 2019.
- MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- PEÑARANDA, J. D.; BUENO, M.; ÁLVAREZ, F.; PÉREZ, P. D.; PEREZÁBAD, L. Sprouted grains in product development. Case studies of sprouted wheat for baking flours and fermented beverages. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 25, p. 1-9, 2021.
- RASERA, G. B. R.; de CASTRO, R. J.S. Germinação de grãos: Uma revisão sistemática de como os processos bioquímicos envolvidos afetam o conteúdo e o perfil de compostos fenólicos e suas propriedades antioxidantes. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 287-300, 2020.