



POTENCIAL ANTIOXIDANTE E RISCOS MICROBIOLÓGICOS DE GRÃOS GERMINADOS PARA ALIMENTAÇÃO HUMANA

Palavras-Chave: GERMINAÇÃO DOS GRÃOS, ATIVIDADE MICROBIANA, SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA

Autor:

JEAN DE OLIVEIRA LOPES [UNICAMP]

Orientadoras:

Prof.^a Dr.^a ADRIANE ANTUNES DE MORAES [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a ROBERTA FONTANIVE MIYAHIRA [UERJ]

INTRODUÇÃO

Atualmente tem sido observada correlação entre padrão alimentar e o surgimento de doenças, sendo que o consumidor tem se tornado mais conscientes em relação às suas escolhas alimentares[1]. Alimentos *in natura*, minimamente processados, fermentados e grãos germinados têm atraído a atenção da população com foco em saudabilidade. Dessa forma, o consumo de cereais e leguminosas colhidos em estágios iniciais (denominados popularmente como grãos germinados) está em ascensão [2].

Alguns estudos observaram vários benefícios associados ao consumo dos grãos germinados, tais como alta capacidade antioxidante devido à presença de polifenóis, ácido ascórbico, carotenóide e tocoferóis, que são capazes de atenuar os danos oxidativos nas células[3,4]. Esses compostos antioxidantes agem retardando a velocidade de oxidação através da inibição dos radicais livres, podendo por exemplo, auxiliar no processo da redução do oxigênio singlete e na quelatação de metais, promovendo proteção ao rompimento de tecidos [5].

Entretanto, pouco se fala em relação aos riscos microbiológicos associados aos grãos germinados, uma vez que esses possuem características propícias para o desenvolvimento microbiano e que seu consumo está relacionado à diversos surtos alimentares [6]. Portanto, a presente pesquisa avaliou os processos de germinação dos grãos de trigo, lentilha e brócolis, bem como a digestão simulada nos mesmos, levando em consideração além de aspectos nutricionais a sua qualidade microbiológica.

METODOLOGIA

1. Germinação dos Grãos

Para esse procedimento, os grãos foram colocados separadamente em recipientes de vidro e cobertos com água filtrada. Em seguida, ficaram de 8 a 12 h em ambiente escuro; e passado esse tempo, foi descartada a água de imersão e os grãos foram lavados. Após essas etapas, foram transferidos para outro recipiente, agora com uma abertura maior e cobertos por tela. Os vidros foram posicionados inclinados de forma que o excesso de líquido pudesse escorrer. Por fim, foram mantidos em ambiente sombreado e fresco até a germinação[7]. A germinação foi repetida 2 vezes de forma independente.

2. Caracterização microbiológica

Visto que não existe, até o momento no Brasil, uma legislação específica com padrões microbiológicos para grãos germinados foram adotadas as recomendações da Instrução Normativa N. 60[8].

A técnica *pour plate*, foi utilizada para analisar aeróbios mesófilos, sendo feito o plaqueamento em meio de cultura Ágar Padrão de Contagem (PCA) e incubação a 35°C por 48h [9].

A contagem de coliformes a 30-35°C e de *E. coli*, foi realizada através da técnica de 3M™ Petrifilm™. Já para a análise de *Salmonella* spp foi determinada a presença ou ausência do gênero por meio do método descrito no Bacteriological Analytical Manual (BAM) da Food and Drug Association[10]. O método inclui, resumidamente, as etapas de pré-enriquecimento em Caldo Lactosado e posterior inoculação da amostra nos meios seletivos Caldo Tetrionato (TT) e Caldo Selenito Cistina (SC). Após incubação nos meios seletivos, foi realizado plaqueamento diferencial utilizando Ágar Entérico de Hectoen (HE) e Ágar Xilose Lisina (XLD) e verificação do crescimento de colônias típicas. Estas colônias, quando presentes, foram inoculadas em tubos inclinados com Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e as placas, armazenadas para a etapa de confirmação. Quando observada reação bioquímica típica nestes tubos foram estocados repiques, para posteriormente, confirmação de presença/ausência de *Salmonella* ssp. Todas estas etapas exigiam incubação a 35°C por 24h cada.

Todas as amostras foram avaliadas antes e depois da sanitização em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 minutos.

3. Digestão Simulada

Após a germinação dos grãos de trigo, milho e lentilha foi realizada a análise de digestão simulada, adotando o método descrito por Gil-Izquierdo et al. [11]. Os produtos da digestão gástrica e entérica foram analisados por Folin-Ciocalteu para quantificação de fenólicos totais e ABTS para atividade antioxidante, assim como o conteúdo dialisado para determinação da biodisponibilidade destes compostos.

4. Teor de fenólicos totais

Para determinação do teor de fenólicos totais nas amostras de grãos germinados foi utilizado o método Folin-Ciocalteu, descrito no trabalho de Singleton et al. com adaptação para microvolumes[12].

5. Atividade antioxidante

Foi realizado o método de ABTS que se baseia na redução do ABTS+ na presença de um antioxidante, que apresenta coloração azul esverdeado devido à reação com o persulfato de potássio. Essa redução ocasiona perda desta coloração, medida por espectrofotometria. Foram avaliadas as atividades antioxidantes dos grãos germinados e em cada fase da digestão *in vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caraterização Microbiológica

O resultado da contagem de aeróbios mesófilos e de Coliformes a 35°C encontra-se expressos na Tabela 1. Para o primeiro grupo de microrganismos indicadores foi possível observar uma diminuição de cerca de 2 ciclos logarítmicos após sanitização. Ainda assim as contagens microbianas de aeróbios mesófilos permaneceram muito elevadas, com valores acima de 7 log UFC/g de grãos germinados.

Para bactérias do grupo dos Coliformes a 35°C a sanitização também resultou em com reduções de 1 a 2 ciclos logarítmicos após a sanitização, mas as contagens permaneceram entre 6,98 e 7,71 ciclos logarítmicos após sanitização com hipoclorito de sódio. Destaca-se, contudo, que não foi observada presença de *E. coli* nas amostras, de acordo com a coloração diferencial das colônias crescidas em Petrifilm.

Grão germinado	Coliformes a 35°C (log UFC/g ± DP)	Aeróbios Mesófilos (log UFC/g ± DP)
Brócolis	8,65±0,21	9,10±0,77
Brócolis Sanitizado	6,98±0,51	7,34±0,77
Trigo	8,51±0,04	9,17±0,37
Trigo Sanitizado	7,19±0,82	7,80±0,87
Lentilha	8,51±0,21	9,01±0,12
Lentilha Sanitizada	7,71 ±0,82	7,98±0,29

Tabela 1- Média de contagens microbiológicas de grãos germinados (duas germinações independentes), antes e após processos de sanitização

Na análise de *Salmonella* ssp. todas as amostras enriquecidas no caldo Tetrionato (TT) e semeadas nas placas com meio Hectoen apresentaram colônias típicas, essas foram transferidas para tubos inclinados contendo os meios Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). Após a análise com os tubos, todas as amostras apresentaram reação característica de *Salmonella* e serão confirmadas posteriormente.

Teor de fenólicos e antioxidantes:

O teor de compostos fenólicos do brócolis, lentilha e trigo, antes da digestão simulada, foi de 13,214 mg EAG/g, 2,75 mg EAG/g, 5,53 mg EAG/g, respectivamente. Os resultados obtidos com a lentilha apresentam-se de acordo com estudo de Foad e Rehab, 2015 e de Penãs *et al*,2015[13,14]. Já os resultados obtidos para o trigo e brócolis não se assemelham quando comparados com a literatura [16,17], o que poderia ser explicado pelos diferentes métodos de cultivo e a safra do grão [2]. Além

disso, métodos como Folin-Ciocalteu, podem responder outros compostos da amostra causando a diferença relatada [17].

Assim como já era esperado, os índices de fenólicos vão decaindo a cada fase da digestão e esse comportamento se mantém em todas as amostras analisadas. Com a adição das enzimas digestivas os compostos presentes nos grãos podem passar por processo de biotransformação, sendo diferenciados em outros compostos não fenólicos, aumentando, por exemplo, a atividade sequestradora de radicais livres[18].

Essa hipótese pode ser constatada, observando os dados obtidos a partir da análise ABTS que demonstram uma elevação na atividade antioxidante se comparadas ao teor de fenólicos, conforme expressos nos gráficos 1 e 2.

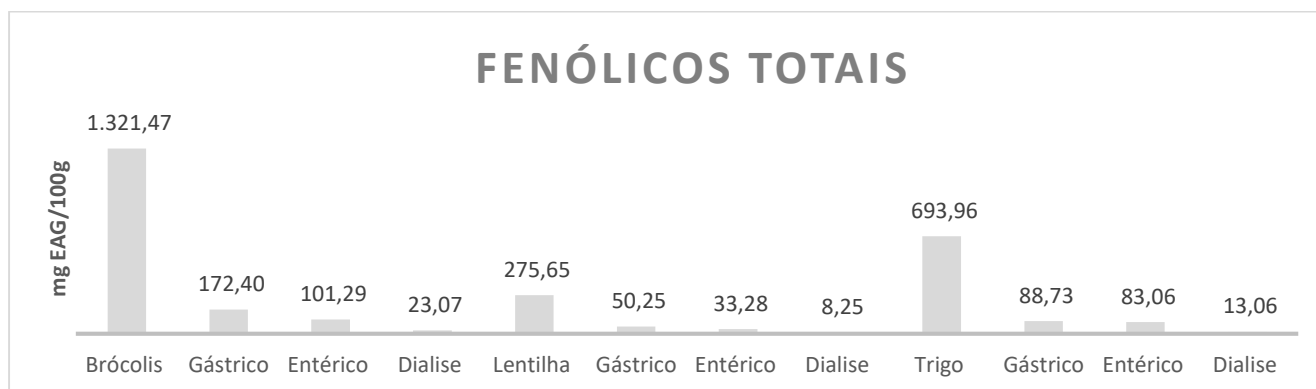


Gráfico 1- Fenólicos Totais em grãos germinados a cada fase da digestão.



Gráfico 2- ABTS em grão germinados a cada fase da digestão.

CONCLUSÕES:

Conclui-se que a sanitização dos grãos com hipoclorito de sódio reduziu de 1 a 2 ciclos log as contagens de aeróbios mesófilos e Coliformes da 35°C, porém as contagens destes grupos de microrganismos indicadores permaneceram ainda muito elevadas (entre 6 e 9 ciclos log UFC/g). Esse resultado sugere a necessidade de prospecção de outros métodos que visem redução de carga microbiana na tentativa de tornar o consumo destes alimentos mais seguro. Durante a digestão simulada observou-se uma elevação na atividade antioxidante dos grãos germinados. Cabe ressaltar que em função da pandemia, algumas análises previstas não puderam ser realizadas, tornando alguns resultados inconclusivos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] MRIDULA, D.; SHARMA, M.; GUPTA, R. **Development of quick cooking multi-grain dalia utilizing sprouted grains**. Journal of food science and technology, 52, n. 9, p. 5826-5833, 2015.
- [2] BENINCASA, P.; FALCINELLI, B.; LUTTS, S.; STAGNARI, F. et al. **Sprouted grains: A comprehensive review**. Nutrients, 11, n. 2, p. 421,
- [3] BAILLY, C. **Active oxygen species and antioxidants in seed biology**. Seed Science Research, 14, n. 2, p. 93-107, 2004.
- [4] TUAN, P. A.; THWE, A. A.; KIM, Y. B.; KIM, J. K. et al. **Effects of white, blue, and red light-emitting diodes on carotenoid biosynthetic gene expression levels and carotenoid accumulation in sprouts of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)**. Journal of agricultural and food chemistry, 61, n. 50, p. 12356-12361, 2013.
- [5] DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício et al. **Avaliação Atividade Antioxidante Utilizando Sistema B-Caroteno/Ácido Linoléico e Método de Sequestro de Radicais Dpph**, 26, p.446-452, 2006.
- [6] MIYAHIRA, R. F., ANTUNES A. E. C. **Bacteriological safety of sprouts: A brief review**. Int J Food Microbiol 16;352 p. 109266, 2021
- [7] BARANZELLI, J. et al **Changes in enzymatic activity, technological quality and gamma-aminobutyric acid (GABA) content of wheat flour as affected by germination**, LWT 90, p.483-490, 2018.
- [8] DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Constituição (2019). **Instrução Normativa N° 60**, de 23 de Dezembro de 2019. 249. ed. Brasil, 26 dez. 2019. Seção 1, p. 133.
- [9] APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 15th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2015.
- [10] FDA. Salmonella. In: ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. (Eds.). **Bacteriological Analytical Manual**. 8. ed. [s.l.] Food and Drug Administration, 2007.
- [11] GIL-IZQUIERDO, A.; ZAFRILLA, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. **An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract**. European Food Research and Technology, v. 214, n. 2, p. 155–159, 2002.
- [12] SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent**. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 299p. 152–178.
- [13] FOUAD, A. A.; REHAB, F.M. **Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris* Medik.) sprouts**. Acta Sci Pol Technol Aliment. Jul-Sep;14(3):233-246, 2015.
- [14] PEÑAS, E. et al. **Impact of Elicitation on Antioxidant and Potential Antihypertensive Properties of Lentil Sprouts**. *Plant Foods Hum Nutr* 70, 401–407, 2015.
- [15] TOMÉ-SÁNCHEZ, I et al. **Soluble Phenolic Composition Tailored by Germination Conditions Accompany Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Wheat**. *Antioxidants* , 9, 426, 2020.
- [16] LE, T. N. et al **Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Sprouts as the Potential Food Source for Bioactive Properties: A Comprehensive Study on In Vitro Disease Models**. Foods. 30;8(11):532, 2019.
- [17] PENA, F. L. et al **Probiotic fermented milk with high content of polyphenols: Study of viability and bioaccessibility after simulated digestion**. International Journal of Dairy Technology. 74(1), 170-180, 2020.
- [18] DUEÑAS, M. et al. **Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans**. *Food Research International*. 70, 50-53, 2015