



# EFEITOS DA DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO* SOBRE AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE GRÃOS DE MOSTARDA

**Palavras-Chave:** Germinação, digestão simulada *in vitro*, grãos de mostarda

**Autores/as:**

Ana Clara de Araújo Cardoso – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Gabriela Boscarol Rasera – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador) - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

---

## INTRODUÇÃO:

O estilo de vida da maioria das pessoas está mudando, juntamente com a demanda por alimentos naturais. Os compostos fenólicos são, provavelmente, uma das classes mais estudadas e abordadas na literatura. Para a compreensão da relevância desses compostos na saúde humana, é essencial ter o conhecimento da quantidade de polifenóis consumida e a parcela que se torna bioacessível e posteriormente biodisponível (SAURA-CALIXTO; SERRANO; GOÑI, 2007).

Bioacessibilidade é o termo utilizado para a fração de um composto que é extraída e solubilizada da matriz alimentar por meio do processo digestivo. A bioacessibilidade é influenciada pela estrutura e composição dos compostos fenólicos presentes na matriz alimentar, assim como suas possíveis interações. Efeitos sinérgicos e antagônicos entre os diferentes compostos ali presentes, características físico-químicas como pH, composição química e textura da matriz são alguns exemplos de parâmetros que contribuem para a singularidade de cada alimento (SAURA-CALIXTO; SERRANO; GOÑI, 2007). A parte dessa fração que é absorvida pelos enterócitos e atinge a corrente sanguínea é chamada de fração biodisponível (FLYNN, 2007).

Entender como os compostos bioativos serão afetados após o processo de digestão torna-se um conhecimento valioso, visto que responde ao seguinte questionamento: qual fração estará efetivamente disponível para ser absorvida pelas células do intestino com consequente disponibilização na corrente sanguínea após passagem pelas principais ações metabólicas no organismo? Nesse sentido, a utilização de protocolos de digestão *in vitro* pode mimetizar essas ações e auxiliar no esclarecimento da real função de compostos bioativos sobre funções fisiológicas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as propriedades antioxidantes e o teor de compostos fenólicos totais da fração bioacessível de extratos de grãos de mostarda preta (*Brassica nigra*) germinados (PG) e não germinados (PNG).

## METODOLOGIA:

Os grãos de mostarda preta (*Brassica nigra*) foram adquiridos no mercado local de Piracicaba (São Paulo, Brasil). Os grãos não germinados foram liofilizados, moídos e desengordurados. As farinhas foram armazenadas na ausência de oxigênio a -18°C.

Já os grãos germinados foram higienizados com água corrente e deixados em béquer com água destilada (1g/100mL) por 12 h para o processo de embebição. O excesso de água foi descartado e os grãos dispostos em folhas de papel filtro em monocamada e armazenados sob condições adequadas para germinação: 48 h de incubação a 25°C com períodos alternados de luz e escuro (RASERA; HILKNER; DE CASTRO, 2020). Após a germinação, os brotos foram liofilizados, triturados, desengordurados e as farinhas foram armazenadas na ausência de oxigênio a -18°C.



**Figura 1.** Grãos de Mostarda Preta (*Brassica nigra*).

A simulação de digestão *in vitro* foi realizada com base no protocolo de digestão simulada INFOGEST (BRODKORB et al., 2019). As atividades das enzimas digestivas e a concentração de sais biliares foram determinadas experimentalmente usando os ensaios padronizados para amilase, pepsina, tripsina e sais biliares.

Após a digestão, as frações foram recolhidas, centrifugadas (17000 g a 5°C por 20 min) e os sobrenadantes foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos totais (CFT<sup>5</sup>) e potencial antioxidante (ABTS<sup>1</sup>, DPPH<sup>1</sup> e FRAP<sup>2,8</sup>). Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com o auxílio do software Minitab® 19 de Minitab Inc. (Pensilvânia, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A execução correta e segura do protocolo INFOGEST deve ser rigorosamente iniciada com a determinação das atividades das enzimas que serão aplicadas. Essas determinações tornam-se necessárias pelas flutuações naturais de valores que podem existir entre os diferentes lotes dos produtos disponibilizados. Assim, para padronização do protocolo, as atividades de todas as enzimas foram previamente determinadas e os resultados estão dispostos na Tabela 1.

A variação percentual entre os valores declarados pelo fabricante (ou constantes no protocolo) mostram a importância de determinar previamente as atividades enzimáticas para ajustar as condições de ensaio. Essa padronização permite harmonizar o protocolo e facilita a comparação com ensaios de digestão *in vitro* conduzidos por outros grupos de pesquisa.

Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais (CFT) e para atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e poder de redução do íon ferro (FRAP) para a farinha de mostarda germinada e não germinada e digerida e não digerida estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 1.** Atividades enzimáticas determinadas para as enzimas utilizadas na digestão in vitro e variação % em relação aos valores apresentados no protocolo ou declarados pelo fabricante.

Enzimas	Valores apresentados no protocolo ou declarados pelo fabricante	Valor determinado em laboratório	Varição (%)
$\alpha$ -amilase salivar	108,90 U mg <sup>-1</sup>	93,05 U mg <sup>-1</sup>	- 14,55
Pepsina	> 2.500 U mg <sup>-1</sup>	1.932,80 U mg <sup>-1</sup>	- 22,68
Tripsina	4,56 U mg <sup>-1</sup>	2,60 U mg <sup>-1</sup>	- 42,98

Os resultados foram avaliados sob três perspectivas:

1. Efeito da germinação: calculado por meio da comparação entre as amostras não germinada e germinada, de acordo com a equação abaixo:

- Para amostras não digeridas: Efeito da germinação (%) =  $\{[(\text{Controle germinado} - \text{controle não germinado}) / (\text{controle não germinado})] \times 100\}$
- Para amostras digeridas: Efeito da germinação (%) =  $\{[(\text{farinha de mostarda preta digerida e germinada} - \text{farinha de mostarda preta digerida não germinado}) / (\text{farinha de mostarda preta digerida não germinado})] \times 100\}$

2. Efeito da digestão: calculado através da comparação entre o controle e a amostra digerida, de acordo com a equação abaixo:

- Efeito da digestão (%) =  $\{[(\text{farinha de mostarda preta digerida não germinada} - \text{controle não germinado}) / (\text{controle não germinado})] \times 100\}$

3. Efeito da germinação em conjunto com a digestão, de acordo com a equação abaixo:

- Efeito da germinação + digestão (%) =  $\{[(\text{farinha de mostarda preta digerida germinada}) - (\text{farinha de mostarda preta digerida não germinada}) / (\text{farinha de mostarda preta digerida não germinada})] \times 100\}$

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a germinação e a digestão, individualmente, promoveram aumento do teor de CFT e das propriedades antioxidantes. No entanto, podemos inferir que a germinação aliada à digestão não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) para as mesmas respostas avaliadas na farinha de mostarda preta (Tabela 2).

Em relação à digestão, foi possível observar que a ação dos componentes da digestão não afetou negativamente o teor de CFT e as propriedades antioxidantes da farinha de mostarda preta (não germinada ou germinada), e em alguns casos, até aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) essas respostas (Tabela 2). Os resultados mais positivos foram observados para as respostas teor de CFT e para atividade antioxidante medida pelo método ABTS, as quais apresentaram aumentos de 132% e 124%, respectivamente, para a amostra não germinada digerida em relação ao controle (amostra não digerida).

**Tabela 2.** Compostos fenólicos totais (CFT) e propriedades antioxidantes de farinha de mostarda preta germinada e não germinada após digestão simulada in vitro.

<i>Compostos fenólicos totais (CFT) (mg AGE g<sup>-1</sup>)</i>					
Amostra	Não germinada	Germinada	Efeito da germinação (%) <sup>1</sup>	Efeito da digestão (%) <sup>2</sup>	Efeito da germinação + digestão (%) <sup>3</sup>
Controle	13,79 ± 2,37 <sup>b</sup>	14,84 ± 0,81 <sup>b</sup>	7,61	131,91	Não aplicável
Farinha de mostarda preta digerida	31,98 ± 2,03 <sup>a</sup>	32,07 ± 0,97 <sup>a</sup>	0,28	116,11	132,56
<i>Inibição do radical ABTS (μmol TE g<sup>-1</sup>)</i>					
Amostra	Não germinada	Germinada	Efeito da germinação (%) <sup>1</sup>	Efeito da digestão (%) <sup>2</sup>	Efeito da germinação + digestão (%) <sup>3</sup>
Controle	75,21 ± 4,89 <sup>c</sup>	97,16 ± 6,84 <sup>b</sup>	29,18	124,84	Não aplicável
Farinha de mostarda preta digerida	169,10 ± 11,16 <sup>a</sup>	176,82 ± 0,76 <sup>a</sup>	4,57	81,99	135,10
<i>Capacidade de redução de radicais DPPH (μmol TE g<sup>-1</sup>)</i>					
Amostra	Não germinada	Germinada	Efeito da germinação (%) <sup>1</sup>	Efeito da digestão (%) <sup>2</sup>	Efeito da germinação + digestão (%) <sup>3</sup>
Controle	62,68 ± 4,29 <sup>a</sup>	66,97 ± 3,67 <sup>a</sup>	6,84	4,77	Não aplicável
Farinha de mostarda preta digerida	65,67 ± 1,22 <sup>a</sup>	64,80 ± 0,53 <sup>a</sup>	-1,32	-3,24	3,38
<i>Poder de redução do íon ferro (FRAP) (μmol TE g<sup>-1</sup>)</i>					
Amostra	Não germinada	Germinada	Efeito da germinação (%) <sup>1</sup>	Efeito da digestão (%) <sup>2</sup>	Efeito da germinação + digestão (%) <sup>3</sup>
Controle	46,07 ± 6,28 <sup>b</sup>	62,26 ± 5,55 <sup>a</sup>	35,14	8,53	Não aplicável
Farinha de mostarda preta digerida	50,00 ± 5,25 <sup>ab</sup>	62,78 ± 3,16 <sup>a</sup>	25,56	0,84	36,27

## CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que o processo de germinação e de digestão isolados promoveram aumento do teor de compostos fenólicos totais e das propriedades antioxidantes da mostarda preta. No entanto, a germinação aliada à digestão não apresentou efeito significativo no aumento do teor de compostos fenólicos totais e nas propriedades antioxidantes da farinha de mostarda preta quando os materiais digeridos (não germinado com germinado, ambos digeridos) foram comparados. Uma hipótese sugerida por nosso grupo de pesquisa é de que a quantidade e a qualidade dos compostos presentes nas amostras sejam diferentes em ambos processos. Dessa forma, a realização de análises adicionais para identificação e quantificação de quais compostos fenólicos estão presentes antes e após a germinação e digestão são fortemente indicados.

## AGRADECIMENTOS:

Agradeço ao CNPq/PIBIC e à Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP) da Unicamp pela bolsa de iniciação científica e a todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, em especial a discente de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Gabriela Boscarol Rasera e ao Professor Doutor Ruann Janser Soares de Castro, por todo apoio e ensinamentos durante o desenvolvimento desse projeto.

---

## BIBLIOGRAFIA

1. AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 2009.
2. BENZIE, 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.
3. BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.
4. FLYNN, E. Pharmacokinetic Parameters. In: **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. [s.l.] Elsevier, p. 1–3, 2007.
5. PEREIRA, G. A.; ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Modification and validation of Folin-Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food samples. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 9, n. 1, p. 125, 2017.
6. RASERA, G. B.; HILKNER, M. H.; DE CASTRO, R. J. S. Free and insoluble-bound phenolics: How does the variation of these compounds affect the antioxidant properties of mustard grains during germination? **Food Research International**, v. 133, p. 109115, 2020.
7. SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492–501, 2007.
8. WIRIYAPHAN, C.; CHITSOMBOON, B.; YONGSAWADIGUL, J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 104–111, 2012.