A INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS E COMPOSTOS FENÓLICOS AFETA AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE GRÃOS DE MOSTARDA DURANTE O PROCESSO DE DIGESTÃO *IN VITRO*?

Fernanda Acuña Caldeira Juncá*, Gabriela Boscariol Rasera, Ruann Janser Soares de Castro

Universidade de Campinas (Unicamp), Departamento de Ciência de Alimentos e Nutrição (DECAN), Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Campinas, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Os compostos fenólicos, grupo conhecido por seu potencial antioxidante, apresentam grande sensibilidade ao processo de digestão gastrointestinal, modificando e muitas vezes diminuindo o seu potencial biológico devido às alterações de pH e complexação com macronutrientes da matriz alimentar. Buscando fomentar e compreender os dados existentes sobre tais interações, o presente trabalho visou estudar os efeitos da interação de extratos fenólicos de grãos de mostarda preta (*Brassica nigra*) germinados com a proteína caseína. As principais estratégias de implementação metodológica para atingir os objetivos descritos incluíram a obtenção dos complexos compostos por fenólicos de mostarda e caseína, execução do protocolo de digestão simulada *in vitro* INFOGEST e avaliação do potencial antioxidante segundo os métodos ABTS, DPPH e FRAP das amostras digeridas e não digeridas. Os resultados obtidos evidenciaram que o processo de digestão aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade antioxidante do complexo caseína-extrato bem como do extrato de mostarda e da solução de caseína isoladamente. A complexação de fenólicos-caseína não promoveu grandes variações sobre a capacidade antioxidante do extrato de mostarda preta germinada quando mensurada pelos métodos DPPH e FRAP, mas reduziu significativamente a capacidade de eliminação de radicais ABTS quando consideradas as amostras digeridas.

Palavras-chave: mostarda; germinação; digestão; complexo proteína-fenólicos; antioxidante.

1. METODOLOGIA

Os grãos de mostarda adquiridos em um mercado local de Piracicaba (São Paulo, Brasil) foram higienizados, deixados de molho em água destilada (1 g mL^{-1}) por 12 horas e em seguida filtrados e dispostos em uma folha de papel filtro para serem germinados nas seguintes condições: 48 horas a 25°C com luz alternada entre claro e escuro (RASERA; HILKNER; DE CASTRO, 2020). Após a germinação, os brotos foram liofilizados, triturados, desengordurados com solução de hexano (1g 100 mL^{-1}) e as farinhas foram embaladas à vácuo e armazenadas a -18°C.

Para a obtenção dos extratos, 1g de farinha dos grãos germinados foi acrescido de 10 mL de solução tampão fosfato (100 mmol L^{-1}, pH 8,0). Em seguida, a mistura foi mantida sob agitação de 100 rpm, à temperatura de 37,5°C por 60 minutos. Para o estudo da interação proteína-fenólicos (caseína + extrato fenólico de mostarda), o processo de complexação foi avaliado com diferentes concentrações da proteína padrão caseína, a saber: 0, 10, 15, 20 e 25 mg mL^{-1}. Para tal, as alíquotas dos extratos (0,1 mg mL^{-1}) foram acrescidas das soluções de caseína (1:1 v:v).

A mistura foi agitada (50 rpm) por 60 minutos e após centrifugação, os sobrenadantes foram coletados para quantificação dos compostos fenólicos totais residuais pelo método de Folin-Ciocalteu (RASERA et al., 2020). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de amostra (AGE g^{-1}) e em termos percentuais considerando a variação relativa do teor de compostos fenólicos amostras antes e após a complexação.

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 α-amilase, pepsina, tripsina e sais biliares. Os extratos de mostarda, a solução de caseína e complexo caseína/extrato fenólico (na concentração em que houve a maior porcentagem de complexação fenólicos-proteína) foram submetidos à simulação da digestão nas fases oral, gástrica e intestinal. Após a digestão, as frações foram recolhidas, centrifugadas (17.000 g a 5°C por 5 min) e os sobrenadantes foram analisados quanto ao potencial antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP (RASERA et al., 2020).

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).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estimar o grau de complexação dos fenólicos de mostarda preta com a caseína, o teor destes compostos foi medido em diferentes condições, como descrito a seguir:

Condição 1 – Solução de proteína (controle): a determinação foi realizada nas soluções de proteínas em diferentes concentrações pelo fato de as mesmas serem interferentes conhecidos no método de Folin-Ciocalteu. Desta forma, a quantificação foi realizada no sentido de corrigir essa interferência.

Condição 2 – Extrato de mostarda (controle) + solução de proteína (controle): refere-se à medida do teor de compostos fenólicos nas duas soluções antes da reação de complexação.

Condição 3 - Extrato de mostarda + solução de proteína (reação): refere-se à medida do teor de compostos fenólicos nas duas soluções após o processo de complexação.

Os resultados obtidos para as amostras de mostarda germinadas são apresentados na Tabela 1. Os resultados evidenciaram a ocorrência de complexação entre os compostos fenólicos de mostarda e a caseína. A partir da análise específica da tabela, verifica-se que o máximo de complexação ocorreu na concentração de 15 mg mL^{-1}, reduzindo em 13,76% o teor de fenólicos nos sobrenadantes após a reação de complexação (Tabela 1). Assim, esta concentração (15 mg mL^{-1}) foi selecionada para condução dos ensaios de digestão.

Ainda no escopo das atividades propostas, uma etapa primordial para a padronização e a execução correta dos experimentos de simulação de digestão *in vitro* inclui a determinação das atividades de preparações comerciais das enzimas (α-amilase, pepsina e tripsina) e o teor de sais biliares em bile bovina. Os resultados obtidos a partir da realização dos métodos oficiais descritos no protocolo estão expostos na Tabela 2.

Seguindo o protocolo de digestão *in vitro* INFOGEST (BRODKORB et al., 2019), o extrato da mostarda, a solução de caseína e o complexo caseína-extrato, foram submetidos às fases: oral, gástrica e intestinal. Os resultados foram avaliados a partir da verificação do efeito da digestão (%) em cada uma das amostras, o qual foi calculado através da comparação entre o controle e a amostra digerida, de acordo com a equação apresentada a seguir:

Efeito da digestão (%) = {[(amostra digerida - amostra não digerida) / (amostra não digerida)] x 100}

Em relação à digestão, foi possível observar que esse processo afetou positivamente as propriedades antioxidantes do extrato de mostarda preta germinada, do complexo caseína/extrato de mostarda e da solução de caseína. Em todas as análises houve um aumento significativo da capacidade antioxidante ($p < 0,05$), especialmente na análise pelo método ABTS, onde o aumento supera 100% para todas as amostras digeridas, quando comparadas com as respectivas amostras não digeridas (Tabela 3). Algumas hipóteses podem ser elaboradas para justificar tal comportamento: i) a hidrólise de proteínas - a caseína, quando digerida pelas enzimas proteolíticas presentes no processo de digestão pode resultar na liberação de peptídeos antioxidantes (GUAN et al., 2021) e ii) a biotransformação de compostos fenólicos, uma vez que que já foi reportado que alguns metabólitos gerados a partir de compostos fenólicos durante a digestão podem apresentar atividade antioxidante não só maior que o composto de origem, como podem ter ação mais prolongada (PINEDA-VADILLO et al., 2016; SPEISKY et al., 2022).

Considerando o grupo de amostras digeridas, a complexação dos fenólicos de mostarda com caseína resultou em redução significativa da atividade antioxidante do extrato quando mensurada pelo método ABTS, enquanto os valores detectados para os métodos DPPH e FRAP apresentaram pouca variação, indicando que os complexos não influenciaram nem positiva nem negativamente a atividade do extrato (Tabela 3). Os dados reportados na literatura ainda são controversos em relação às interações entre fenólicos e proteínas. Acevedo-Fani et al. (2021); Sęczyk; Świeca; Gawlik-Dziki (2017) e Helal; Tagliazucchi (2018) demostraram que a incorporação de extratos aquosos de canela e café verde em matrizes lácteas resultou em aumento da bioacessibilidade de fenólicos, enquanto Paz-Yérez et al. (2019) alegaram redução do potencial antioxidante como consequência da diminuição de acessibilidade dos compostos ligados.

A formação do complexo fenólico-proteína pode na verdade, resultar não só em aumento ou diminuição da bioatividade, mas também em uma mudança completa da mesma. Fatores como bioacessibilidade, efeito da matriz, tipo de composto fenólico, pH, razão molar e características estruturais das moléculas são exemplos de fontes de variação que podem influenciar os resultados obtidos com essa interação. Além disso, a complexação pode alterar as moléculas e consequentemente influenciar o seu comportamento durante a digestão (UDENIGWE et al., 2021).

Tabela 1 – Respostas geradas pelas diferentes condições de ensaio na determinação de compostos fenólicos totais e variação percentual dos resultados após o processo de complexação entre fenólicos dos extratos de mostarda germinada e caseína em diferentes concentrações.

Concentração de caseína (mg mL^{-1})	***Conteúdo de Fenólicos Totais (mg AGE g^{-1})*** [1]			
	Solução de caseína (controle)	**Extrato de mostarda (controle) + Solução de caseína (controle)**	**Extrato de mostarda + Solução de caseína**	**Efeito da digestão (%)**
0	0,0000	0,0445	0,0449	0,89
10	0,0130	0,0575	0,0566	-1,75
15	0,0273	0,0718	0,0631	-13,76
20	0,0316	0,0761	0,0692	-9,89
25	0,0389	0,0834	0,0795	-4,93

[1]A sigla mg AGE g^{-1} corresponde a miligramas de ácido gálico equivalentes por grama de amostra.

Tabela 2 – Atividades enzimáticas de α-amilase, pepsina e tripsina e teor de sais biliares em bile bovina determinados de acordo com métodos descritos no protocolo INFOGEST.

Enzima	Marca/Código	Lote	Resultado
α-amilase	Sigma/A1031-1K	SLB29474	120 U/mg
Pepsina	Sigma/P7012	100117001V	1.696 U/mg
Tripsina em pancreatina	Sigma/P7545	061M1822V	5,8 U/mg
Teor de sais biliares	Sigma/B3883	SLCC7275	5,5 mmol/g

Tabela 3 – Atividades antioxidantes dos diferentes grupos de amostras (solução de caseína, extrato de mostarda e complexo caseína-extrato) antes e após a simulação de digestão in vitro.

Amostra	Não Digerida	Digerida	Efeito da digestão (%)[1]
	Inibição do radical (ABTS) (µmol TE g^{-1})		
Caseína	109,83 ± 4,99 ^{bB}	322,78 ± 10,7 ^{aA}	193,90
Extrato	163,58 ± 6,21 ^{bA}	338,30 ± 7,81 ^{aA}	100,65
Complexo caseína-extrato	104,99 ± 4,03 ^{bB}	285,74 ± 8,16 ^{aB}	132,31
	Capacidade de redução de radicais (DPPH) (µmol TE g^{-1})		
Caseína	66,92 ± 0,51 ^{bB}	71,55 ± 1,46 ^{aB}	6,92
Extrato	73,75 ± 0,59 ^{bA}	82,72 ± 0,61 ^{aA}	12,16
Complexo caseína-extrato	76,04 ± 1,47 ^{bA}	83,23± 1,48 ^{aA}	9,44
	Poder de redução do ferro (FRAP) (µmol TE g^{-1})		
Caseína	12,71 ± 0,27 ^{bC}	19,31 ± 1,36 ^{aC}	51,89
Extrato	58,00 ± 0,80 ^{bA}	62,53 ± 0,38 ^{aB}	7,81
Complexo caseína-extrato	50,71 ± 1,78 ^{bB}	66,43 ± 1,57 ^{aA}	31,00

[1]O efeito da digestão foi calculado considerando a amostra não digerida como valor final e a amostra digerida como valor inicial. Os resultados estão expressos como média (n = 3) ± desvio padrão. Os resultados que apresentam letras minúsculas iguais na mesma linha, são estatisticamente iguais (p <0,05). Os resultados que apresentam letras maiúsculas iguais na mesma coluna, são estatisticamente iguais (p <0,05). A unidade µmol TE g^{-1} corresponde a µmol de Trolox Equivalente por grama de amostra.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que a digestão promoveu um aumento na capacidade antioxidante em todas as amostras analisadas: extrato da mostarda preta germinada, solução de caseína e complexo extrato-caseína. No entanto, quando as amostras digeridas foram avaliadas comparativamente, a complexação dos fenólicos presentes no extrato de mostarda preta germinada com caseína resultou em redução da capacidade de eliminação de radicais ABTS, enquanto a atividade antioxidante do extrato de mostarda medida pelos métodos DPPH e FRAP apresentou pequena variação. Os resultados obtidos encorajam maiores investigações, como a identificação do perfil de compostos fenólicos presentes após a digestão.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de Iniciação Científica dentro do Programa PIBIC -Unicamp. A todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela atenção, suporte e acolhimento, em especial à Doutoranda Gabriela Boscariol Rasera e ao Professor Doutor Ruann Janser Soares de Castro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-FANI, A. et al. Digestive dynamics of yoghurt structure impacting the release and bioaccessibility of the flavonoid rutin. **Food Hydrocolloids**, v. 111, p. 106215, fev. 2021.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, abr. 2019.

GAWLIK-DZIKI, U. et al. Potentially Bioaccessible Phenolic and Antioxidant Potential of Fresh and Stored Lentil Sprouts—Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v Enrichment. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2109, 7 abr. 2021.

GUAN, H. et al. Phenolic-protein interactions in foods and post ingestion: Switches empowering health outcomes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 71–86, dez. 2021.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in-vitro gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. **LWT**, v. 89, p. 164–170, mar. 2018.

PAZ-YÉPEZ, C. et al. Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 196–203, jan. 2019.

PINEDA-VADILLO, C. et al. In vitro digestion of dairy and egg products enriched with grape extracts: Effect of the food matrix on polyphenol bioaccessibility and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 88, p. 284–292, out. 2016.

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.

SĘCZYK, Ł.; ŚWIECA, M.; GAWLIK-DZIKI, U. Soymilk enriched with green coffee phenolics – Antioxidant and nutritional properties in the light of phenolics-food matrix interactions. **Food Chemistry**, v. 223, p. 1–7, maio 2017.