

# CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDAS DE CASTANHA DE CAJU, AVEIA E SOJA FERMENTADAS POR *L. rhamnosus* LRB E SUA VIABILIDADE APÓS DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO*

Palavras-Chave: *Plant-based*; Alimento funcional; Probiótico.

Autor:

JEAN DE OLIVEIRA LOPES -FCA UNICAMP

Co-orientadora:

GIOVANNA ALEXANDRE FABIANO -FCA UNICAMP

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ADRIANE E. ANTUNES DE MORAES -FCA UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO

O setor plant-based tem ganhado destaque no mercado brasileiro, especialmente com bebidas fermentadas devido ao seu potencial funcional. Esses produtos são conhecidos por beneficiar a microbiota intestinal, que é crucial para a saúde geral, incluindo a regulação do metabolismo energético e do sistema imune (MARQUES et al., 2014). Com o aumento do número de vegetarianos e veganos, que já soma 79 milhões segundo a OMS, há uma demanda crescente por mais opções de bebidas vegetais (KUMAR, 2015; OMS, 2021).

A utilização de cepas probióticas em produtos vegetais apresenta desafios, especialmente em garantir a viabilidade das cepas durante o armazenamento e a digestão (RODRIGUES et al., 2019). Este projeto formulou bebidas vegetais fermentadas usando *Lactobacillus rhamnosus* LRB (SACCO, Itália) em castanha de caju, aveia e soja, avaliando sua composição, qualidade microbiológica e viabilidade após digestão simulada *in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Produção das bebidas

Após testes de formulação, a bebida de amêndoa de castanha de caju (ACC), aveia e soja foram preparadas pesando-se a matriz e adicionando água mineral filtrada na proporção de 1g de matriz para 10ml de água, somente na bebida de aveia que a proporção utilizada foi de 1:20 (g/vol.) devido a sua viscosidade. Foram processadas, adicionadas de 7% de sacarose, 3% de inulina e homogeneizadas. Ao final, os extratos foram autoclavados a 115 °C por 18 minutos.

### Controle de fermentação das bebidas vegetais funcionais

A fermentação foi realizada em B.O.D sob temperatura de 37° até atingirem pH 4,5±0,1. Para isso, realizamos a ativação prévia do *L. rhamnosus* LRB em meio MRS caldo estéril por 24h a 37°C, seguido de lavagem

com salina a 0,9% estéril para coleta da massa celular precipitada e inoculação de forma estéril às bebidas. Para o controle da fermentação foram monitorados o pH e a acidez titulável a cada hora.

### **Viabilidade do *L.rhamnosus* LRB nas bebidas vegetais durante o armazenamento**

A sobrevivência do *L. rhamnosus* nas bebidas vegetais formuladas foi avaliada pelo método de contagem em placas em triplicata, com meio MRS ágar, espalhamento *pour-plate*, sobrecamada e incubação a 37°C por 72h, a cada 7 dias durante 28 dias de armazenamento. Além disso, no mesmo período foram aferidos o pH e acidez titulável.

### **Viabilidade do *L.rhamnosus* nas bebidas vegetais durante a digestão simulada *in vitro***

Para o processo de digestão simulada *in vitro*, foi utilizado o protocolo INFOGEST 2.0 (BRODKORB et al., 2019). Ao final de cada fase da digestão, para determinar a viabilidade do *L. rhamnosus*, foram coletadas amostras de cada bebida vegetal digerida, sendo utilizadas imediatamente no método de contagem em placas.

### **Composição centesimal**

Para determinação da composição centesimal das bebidas foi empregado os métodos de secagem em estufa para umidade e cinzas (AOAC, 2016), método Kjeldahl pra proteínas (AOAC, 2016), método Bligh Dyer (BLIGH e DYER, 1959) para lipídios e soma da diferença para carboidratos (AOAC, 2016).

### **Caracterização microbiológica**

Seguindo a Instrução Normativa número 60 (BRASIL, 2019), foram empregadas análises microbiológicas de *Bacillus cereus* presuntivo, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella ssp.*, bolores e leveduras a partir dos métodos da American Public Health Association (RYU; WOLF-HALL, 2015 e BENNET; TALLENT; HAIT, 2015 e KORNACKI; GURTLER; STAWICK, 2015).

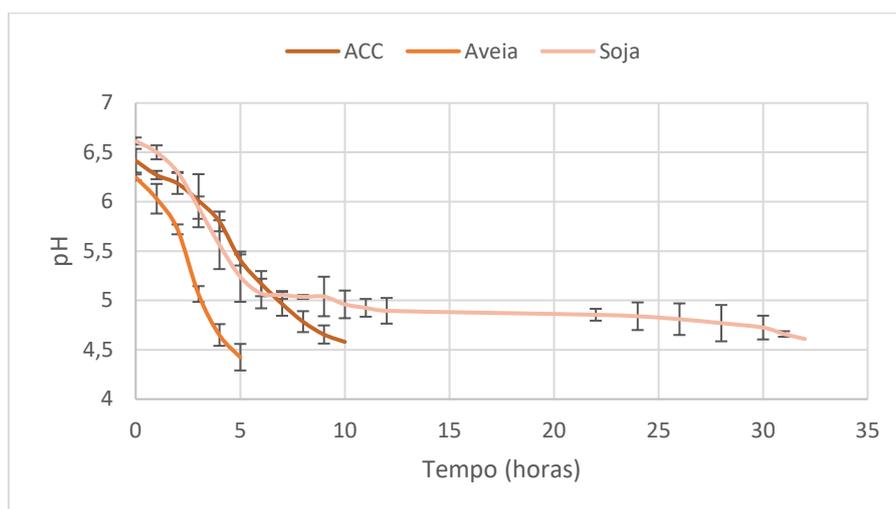
### **Análise estatística**

Foram calculadas a média e o desvio padrão (DP) de todas as repetições para apresentação dos resultados. Seguindo da normalidade e variância, para comparação das multivariáveis da viabilidade durante a digestão. Assim, aplicou-se o teste Two-way ANOVA com Tukey, considerando estatisticamente significante  $p < 0,05$ , utilizando o software Graphpad Prism 8.0.2.

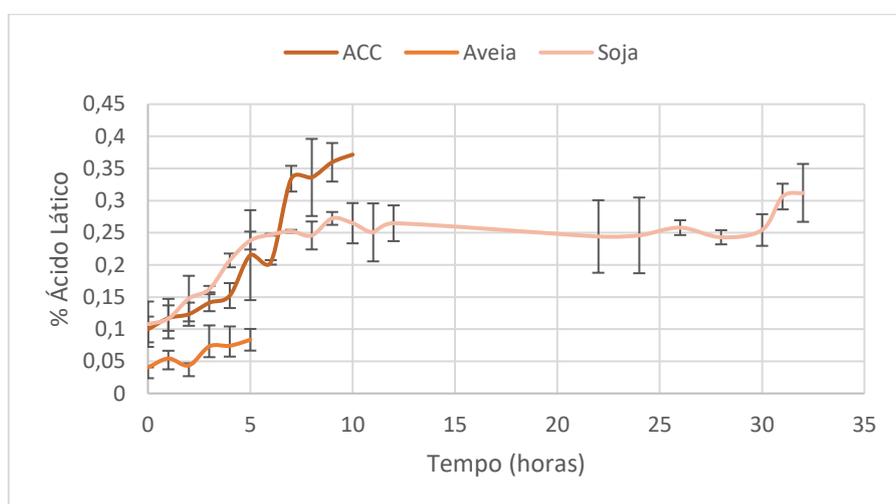
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Fermentação e Acidez Titulável**

O processo fermentativo durou cerca de 5h, 10h e 32h, para aveia, ACC e soja respectivamente. Os resultados da alteração do pH e produção de ácido lático durante a fermentação encontram-se expressos na Figura 1 e Figura 2.



**Figura 1.** Curva de redução do pH (média  $\pm$  DP) durante a fermentação das bebidas de ACC (amêndoa de castanha de caju), aveia e soja.



**Figura 2.** Curva de produção de ácido láctico (média%  $\pm$  DP) durante a fermentação das bebidas de ACC (amêndoa de castanha de caju), aveia e soja.

### Viabilidade da cultura durante o tempo de armazenamento

Entre as três matrizes avaliadas, observou-se que a bebida de aveia proporcionou a melhor preservação da viabilidade da cultura ao longo de 28 dias. Esses resultados indicam que a matriz aveia pode ser considerada mais eficaz na manutenção da sobrevivência de probióticos. Os resultados encontram-se expressos no quadro 1.

**Quadro 1.** Viabilidade do *L. rhamnosus* LRB, pH e ácido láctico (média  $\pm$  DP) durante armazenamento de 28 dias das bebidas ACC (amêndoa de castanha de caju), aveia e soja.

	Dias de Armazenamento	pH	Ácido láctico (%)	log UFC.mL <sup>-1</sup>	Taxa de sobrevivência (%)
Bebida de ACC	0	4,58 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,03	8,74 $\pm$ 0,43	100
	7	4,60 $\pm$ 0,052	0,19 $\pm$ 0,15	8,02 $\pm$ 0,01	91,74
	14	4,59 $\pm$ 0,1	0,20 $\pm$ 0,3	8,16 $\pm$ 0,05	93,36

<b>Bebida de Aveia</b>	21	4,62±0,1	0,21±0,1	8,10±0,00	92,68
	28	4,63±0,08	0,20±0,45	8,03±0,05	91,87
	0	4,42±0,1	0,08±0,02	8,62±0,04	100
	7	4,48±0,03	0,08±0,63	8,52±0,04	98,84
	14	4,45±0,1	0,06±0,22	8,41±0,05	97,56
	21	4,46±0,07	0,07±0,8	8,60±0,03	99,77
<b>Bebida de Soja</b>	28	4,48±0,01	0,07±0,1	8,61±0,02	99,88
	0	4,60±0,04	0,31±0,04	9,00±0,05	100
	7	4,65±0,01	0,38±0,05	8,92±0,08	99,11
	14	4,67±0,12	0,36±0,55	8,19±0,11	91
	21	4,61±0,03	0,40±0,13	8,28±0,05	92
	28	4,63±0,1	0,43±0,46	8,51±0,01	94,33

### Composição centesimal

A partir dos métodos empregados obtivemos os seguintes resultados apresentados no quadro 2.

**Quadro 2.** Composição centesimal (média ± DP) das bebidas de soja, amêndoa de castanha de caju (ACC) e aveia.

(%)	Soja	ACC	Aveia
<b>Umidade</b>	88,46±0,16	87,01±0,11	89,34±0,13
<b>Cinza</b>	0,19±0,11	0,12±0,08	0,21±0,18
<b>Proteína</b>	1,76±0,07	1,06±0,04	0,64± 0,19
<b>Lipídio</b>	1,03±0,08	1,72±0,32	0,69±0,06
<b>Carboidrato</b>	8,55±0,08	10,09±0,30	9,12±0,44

Os resultados de composição centesimal das nossas bebidas encontram-se em acordo com os relatados em estudos de Lima *et al.* (2020), Jeske *et al* (2017), Barros e Venturini Filho (2016) e Ravindran e Radhai Sri (2020).

### Caracterização Microbiológica

As bebidas apresentam contagens <10 UFC/mL em *para B.cereus* presuntivo, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras, além de ausente para *Salmonella ssp.*, garantindo assim segurança microbiológica para consumo das bebidas.

### Viabilidade durante a digestão simulada *in vitro*

A partir dos dados é possível observar que entre as fases da digestão para cada amostra a contagem decai significativamente. Apesar disso, após a fase intestinal as contagens encontram-se próximas ao mínimo sugerido para promover saúde humana, de >6 log UFC/ml segundo Hussain *et al.* (2016).

Assim, todas as bebidas fermentadas com *L. rhamnosus* LRB demonstram-se em contagem recomendada para efeito funcional. Conforme Tabela 1, as contagens obtidas de *rhamnosus* LRB para as bebidas de diferentes matrizes antes da digestão foram equivalentes. Após a fase entérica, observou-se sobrevivência superior da cultura láctica na bebida de soja.

**Tabela 1.** Viabilidade do *L. rhamnosus* LR B nas bebidas vegetais em cada fase da digestão simulada *in vitro*<sup>1</sup>.

	Castanha (log UFC/ml)	Aveia (log UFC/ml)	Soja (log UFC/ml)
Sem digerir	8,43±0,09 <sup>A, a</sup>	8,15±0,07 <sup>A, b</sup>	8,69±0,06 <sup>A, a</sup>
Após fase gástrica	5,05±0,27 <sup>B, a</sup>	7,34±0,17 <sup>B, b</sup>	6,41±0,01 <sup>B, c</sup>
Após fase intestinal	5,76±0,12 <sup>B, a</sup>	5,81±0,08 <sup>C, a</sup>	6,17±0,03 <sup>C, b</sup>

<sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$

<sup>1</sup> Os valores foram descritos em Média ± Desvio Padrão

## CONCLUSÕES

A partir do exposto, concluímos que as matrizes vegetais testadas foram capazes de proteger a potencial cepa probiótica durante o armazenamento e digestão simulada *in vitro*, sendo uma alternativa para o mercado funcional e *plant-based*. Mais estudos são necessários a fim de se confirmar os benefícios da cepa utilizada.

## BIBLIOGRAFIA

- AOAC, A. OF O. A. C. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15. ed. [s.l.: s.n.]. v. 2
- AOAC, A. OF O. A. C. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18. ed. [s.l.: s.n.].
- BARROS, É., VENTURINI FILHO W., Caracterização físico-química e sensorial de extrato hidrossolúvel de soja obtido por diferentes métodos de processamento. **Rev. Bras. Tecnol. Agroind**, 10, 2038–2051, 2016.
- BENNET, R.; TALLENT, S.; HAIT, J. Bacillus cereus and Bacillus cereus Toxins. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5. ed. [s.l.] American Public Health Association (APHA), 2015.
- BLIGH, E.; DYER, W., A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, 37, 8, 911-917, 1959.
- BRASIL, M. DA S. A. N. DE V. S. Instrução normativa n o 60, de 23 de dezembro de 2019., 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 2 fev. 2022
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v.14, n. 4, p. 991–1014, 18 abr. 2019.
- HUSSAIN S. A. *et al.* Ingredient formulation effects on physico-chemical, sensory, textural properties and probiotic count of Aloe vera probiotic dahi. **LWT – Food Science and Technology**, 65, 371-380, 2016.
- JESKE, S. et al. Evaluation of Physicochemical and Glycaemic Properties of Commercial Plant-Based Milk Substitutes. **Plant Foods for Human Nutrition**.72, 26-33, 2017.
- RAVINDRAN, S. RADHAISRI S. Probiotic oats milk drink with microencapsulated Lactobacillus plantarum – an alternative to dairy products. **Nutrition & Food Science**.51, 3, 471–482, 2020.
- KORNACKI, J.; GURTLER, J.; STAWICK, B. Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. [s.l.] American Public Health Association (APHA), 2015.
- LIMA, J. et al. Cashew nut-based beverage: Development, characteristics and stability during refrigerated storage. **Food Sci. Technol**,41, 60–64, 2021.
- MARQUES, T.M.; Cryan, J.F.; Shanahan, F.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P.; Dinan, T.G.; Stanton, C. Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut–brain axis. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, 22, 239–247. 2014
- RYU, D.; WOLF-HALL, C. Yeasts and Molds. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. [s.l.] American Public Health Association (APHA), 2015.