



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.^a Dr.^a 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.

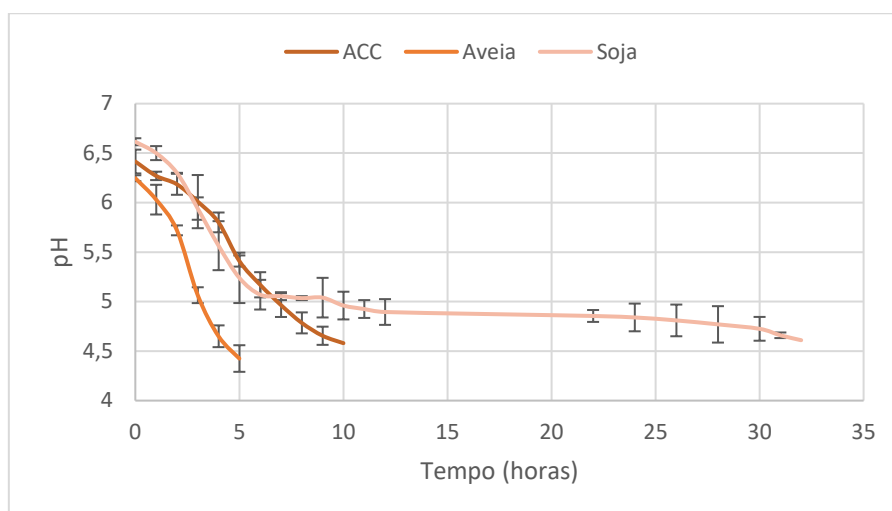


Figura 1. Curva de redução do pH (média \pm DP) durante a fermentação das bebidas de ACC (amêndoa de castanha de caju), aveia e soja.

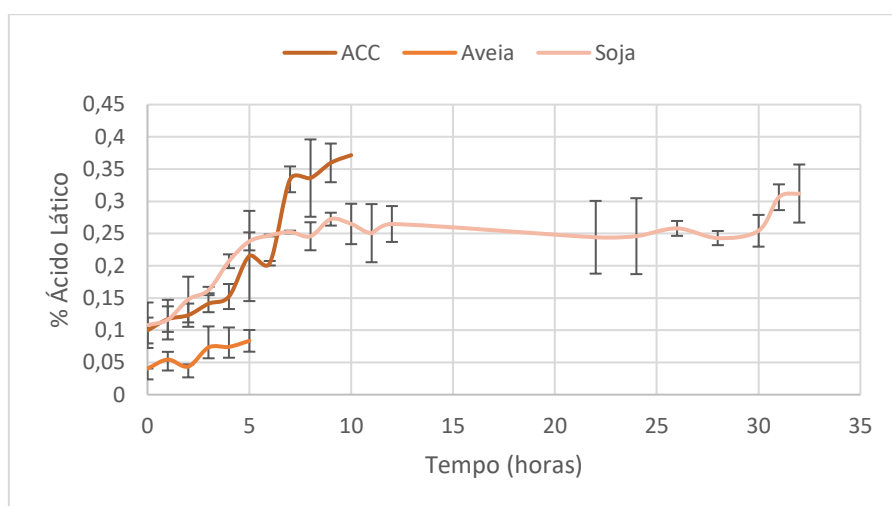


Figura 2. Curva de produção de ácido láctico (média% \pm DP) durante a fermentação das bebidas de ACC (amêndoa de castanha de caju), aveia e soja.

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 ⁻¹ | 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 |

| | | | | | |
|------------------------|----|-----------|-----------|-----------|-------|
| Bebida de Aveia | 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 |
| Bebida de Soja | 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 |
|--------------------|------------|------------|------------|
| Umidade | 88,46±0,16 | 87,01±0,11 | 89,34±0,13 |
| Cinza | 0,19±0,11 | 0,12±0,08 | 0,21±0,18 |
| Proteína | 1,76±0,07 | 1,06±0,04 | 0,64± 0,19 |
| Lipídio | 1,03±0,08 | 1,72±0,32 | 0,69±0,06 |
| Carboidrato | 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*¹.

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

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

¹ 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.