

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Tháisa Santana de Oliveira

**Potencial probiótico, prebiótico e antioxidante de uma bebida vegetal fermentada com  
adição de polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*)**

Florianópolis

2022

Tháisa Santana de Oliveira

**Potencial probiótico, prebiótico e antioxidante de uma bebida vegetal fermentada com  
adição de polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Nutrição

Orientadora: Prof. Dra<sup>a</sup> Silvani Verruck

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Oliveira, Thaísa  
Potencial probiótico, prebiótico e antioxidante de uma  
bebida vegetal fermentada com adição de polpa de uvaia  
(*Eugenia pyriformis*) / Thaísa de Oliveira ; orientadora,  
Silvani Verruck, 2022.  
27 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
da Saúde, Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Proteína de arroz. 3. Proteína de ervilha.  
4. Frutas nativas brasileiras. 5. *Lacticaseibacillus*  
*rhamnosus* GG. I. Verruck, Silvani. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Graduação em Nutrição. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

**DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO ORIENTADOR**

Eu, Silvani Verruck, professora do Curso de Nutrição, lotada no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), declaro anuência com a versão final do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) da aluna Thaísa Santana de Oliveira, submetido ao Repositório Institucional da UFSC.

Florianópolis, 09 de dezembro de 2022.



Documento assinado digitalmente

SILVANI VERRUCK

Data: 09/12/2022 19:10:25-0300

CPF: \*\*\*.960.859-\*\*\*

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Profa. Dra. Silvani Verruck

Orientadora do TCC

## RESUMO

Ao longo dos anos, houve um aumento na busca por alimentos à base de plantas como alternativas às proteínas animais. Aliado a esse interesse, os alimentos funcionais probióticos e prebióticos também são de grande interesse dos consumidores. Estudos recentes indicam que compostos fenólicos podem atuar como prebióticos, modulando a microbiota intestinal. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial prebiótico da polpa de uvaia (0%, 5% e 10%) adicionada a uma bebida vegetal fermentada com *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG como probiótico e elaborada com proteínas de ervilha e arroz, além da avaliação do potencial antioxidante durante a digestão *in vitro*. A digestibilidade *in vitro* foi realizada seguindo o ensaio de simulação adaptado do INFOGEST, que analisou o comportamento probiótico (*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG) e a bioacessibilidade de compostos bioativos (conteúdo fenólico total e atividade antioxidante) durante as fases oral, gástrica e intestinal (48h). A contagem inicial de células viáveis da bactéria probiótica *L. rhamnosus* GG na bebida adicionada de polpa de uvaia 0%, 5% e 10% correspondeu a 9,30, 9,44, 9,45 log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente. A polpa de uvaia protegeu o probiótico na fase gástrica, provavelmente devido à presença de ácido gálico nestas amostras. As altas contagens de células viáveis permaneceram durante toda a passagem pelo sistema gastrointestinal, incluindo a fase do íleo, onde efetivamente possui maior potencial de ação prebiótica. Ao final da fase intestinal (48h), as amostras controle (106,89%) e as amostras com 5% de polpa de uvaia (109,38%) apresentaram maiores taxas de sobrevivência em relação à amostra adicionada com 10% de polpa de uvaia (102,20%). Por outro lado, o conteúdo fenólico total ao final da simulação gastrointestinal (48h) também foi igual ( $p > 0,05$ ) entre 0% e 5% das amostras de polpa de uvaia (0,61 e 0,54 mg GAE. mL<sup>-1</sup>, respectivamente) e superior ( $p < 0,05$ ) para amostra de 10% (1,29 mg GAE. mL<sup>-1</sup>). O mesmo comportamento ocorre para a atividade antioxidante de 0%, 5% e 10% das amostras pela captura do radical livre 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH) (4,06, 3,96 e 8,44 mg Trolox.mL<sup>-1</sup>, respectivamente), ABTS (10,28, 11,06, 11,97 mg Trolox.mL<sup>-1</sup>, respectivamente) e pelo método *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) (917,02, 863,87 e 1983,23 μM Trolox.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Assim, todas as contagens foram altas ( $> 9$  log UFC g<sup>-1</sup>), indicando que independentemente da adição ou não de 5% de polpa de uvaia, a bebida vegetal à base de proteína de ervilha e arroz representa uma alternativa promissora para carrear *L. rhamnosus* GG. No entanto, a adição de 10% de polpa de uvaia não é recomendada devido à atividade inibitória e de ação antimicrobiana dos compostos fenólicos contra *L. rhamnosus* GG.

**Palavras-chave:** Proteína de arroz; Proteína de Ervilha; Frutas Nativas Brasileiras; *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; Bebida vegetal.

## ABSTRACT

Over the years, there has been an increase in the search for plant-based foods as alternatives to animal proteins. Allied to this interest, probiotic and prebiotic functional foods are also of great interest to consumers. Recent studies indicate that phenolic compounds can act as prebiotics, modulating the intestinal microbiota. In this sense, the objective of this work was to analyze the prebiotic potential of uvaia pulp (0%, 5% and 10%) added to a vegetable beverage fermented with *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG as probiotic and elaborated with pea and rice proteins, in addition to the evaluation antioxidant potential during *in vitro* digestion. The *in vitro* digestibility was performed following the simulation assay adapted from INFOGEST, which analyzed the probiotic behavior (*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG) and the bioaccessibility of bioactive compounds (total phenolic content and antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP during the oral, gastric and intestinal (48h) phases. The initial viable cell count of the probiotic bacteria *L. rhamnosus* GG in the beverage added with 0%, 5% and 10% uvaia pulp corresponded to 9.30, 9.44, 9.45 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively. The uvaia pulp protected the probiotic in the gastric phase, probably due to the presence of gallic acid in these samples. The high viable cell counts remained throughout the passage through the gastrointestinal system, including the ileal phase, where it effectively has a greater potential for prebiotic action. At the end of the intestinal phase (48h), the control samples (106.89%) and the samples with 5% uvaia pulp (109.38%) had higher survival rates efficiency in relation to the sample added with 10% of uvaia pulp (102.20%). On the other hand, the total phenolic content at the end of the gastrointestinal simulation (48h) was also equal ( $p > 0.05$ ) between 0% and 5% of uvaia pulp samples (0.61 and 0.54 mg GAE.mL<sup>-1</sup>, respectively) and higher ( $p < 0.05$ ) for 10% sample (1.29 mg GAE.mL<sup>-1</sup>). The same behavior occurs for the antioxidant activity of 0%, 5% and 10% of the samples by DPPH (4.06, 3.96 and 8.44 mg Trolox.mL<sup>-1</sup>, respectively), ABTS (10.28, 11.06, 11.97 mg Trolox.mL<sup>-1</sup>, respectively) and FRAP (917.02, 863.87 and 1983.23  $\mu$ M Trolox.mL<sup>-1</sup>, respectively). Thus, all counts were high ( $> 9$  log CFU g<sup>-1</sup>), indicating that regardless of the addition or not of 5% uvaia pulp, the vegetable drink based on pea and rice protein represents a promising alternative to carry *L. rhamnosus* GG. However, the addition of 10% of uvaia pulp is not recommended due to the inhibitory activity and antimicrobial action of phenolic compounds against *L. rhamnosus* GG.

**Keywords:** Rice protein; Pea Protein; Brazilian Native Fruit; *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; *Plant-based* Drink.

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da procura por proteínas derivadas de plantas como alternativas às de origem animal se dá principalmente devido à preocupação em torno da saúde, do meio ambiente e do bem estar animal (Boukid *et al.*, 2021). Além de serem fontes mais baratas e sustentáveis, as dietas à base de proteínas vegetais oferecem benefícios à saúde, como a diminuição do colesterol e da pressão arterial (Lu *et al.*, 2019), na função cardioprotetora, na prevenção da obesidade e do diabetes tipo 2 (Alcorta *et al.*, 2021). Atualmente, as proteínas vegetais mais consumidas são as provenientes do trigo e da soja, porém ambas possuem potencial alergênico, o que tem aumentado a procura por outras matrizes vegetais com características hipoalergênicas, ou reduzidas em alérgenos (Zhao *et al.*, 2020). As proteínas de ervilha e arroz são excelentes substitutas das proteínas alergênicas e mantêm sua disponibilidade e valores nutricionais adequados. A combinação da proteína de ervilha e de arroz, garante quantidades suficientes de todos os aminoácidos essenciais à dieta humana (Lu *et al.*, 2019).

Segundo Pua *et al.* (2022), as bebidas à base de plantas ainda enfrentam grandes desafios, como características sensoriais indesejáveis - sabor e aroma típicos de feijões - e a baixa disponibilidade devido aos antinutrientes presentes nos grãos e que são resistentes aos processamentos, inclusive a altas temperaturas. A fermentação surge como uma possível solução para esses desafios, uma vez que além de melhorar as propriedades sensoriais, reduz a concentração de componentes antinutricionais e alergênicos. Além disso, ao usar microrganismos probióticos é possível elaborar uma bebida funcional por meio da acidificação e geração de compostos antimicrobianos competitivos com microrganismos indesejáveis (Alcortata *et al.*, 2021). Bebidas fermentadas são consideradas benéficas à saúde; segundo Lavefve *et al.* (2019), o processo de fermentação por bactérias lácticas (BAL) altera os perfis nutritivos e bioativos das bebidas por meio de atividades enzimáticas e microbianas, o que resulta na produção de uma diversidade de metabólitos secundários que podem exercer ações prebióticas. Certas BAL podem produzir exopolissacarídeos, que melhoram a estabilidade de bebidas, possibilitando a substituição de espessantes, como é o caso de *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Esta cepa também tem sido utilizada em bebidas à base de plantas, devidos aos seus efeitos positivos sobre as propriedades sensoriais dos produtos finais (Masiá *et al.*, 2021).

Ainda pensando na melhora das propriedades sensoriais e nutricionais, a adição de polpas de frutas pode ser uma alternativa. Polpas de frutas são comumente adicionadas a

bebidas, porém, o uso de frutas nativas brasileiras ainda é pouco investigado (Bianchini *et al.*, 2020). O Brasil possui diversos biomas, dentre eles a Mata Atlântica, que produz frutas não convencionais muito nutritivas, como a uvaia (*Eugenia pyriformis*), que possui potencial econômico pouco explorado (Sganzerla *et al.*, 2021). A uvaia pertence à família Myrtaceae, apresentando forma arredondada, achatada e piriforme, de textura macia ou firme e coloração entre tons amarelos e alaranjados; seu aroma é agradável com notas doces e ácidas (da Silva *et al.*, 2019). Sobre os aspectos nutricionais, a uvaia tem sido reconhecida por seu alto valor nutricional e de compostos bioativos (incluindo ácido cafeoilquínico, hexosídeo de ácido gálico, hexosídeo de apigenina, galocatequina, hexosídeo de luteolina, dihexosídeo de miricetina cumaril, entre outros) (de Paulo Farias *et al.*, 2021). É uma fruta com alto teor de vitamina C e A, além de aminoácidos, tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, piroxina e biotina (Sganzerla *et al.*, 2019). Em estudo conduzido por Lopes *et al.* (2018), a ingestão de suco de uvaia por ratas fêmeas demonstrou a diminuição do dano oxidativo, melhorando a eficiência antioxidante e o seu potencial benéfico para a saúde. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi elaborar uma bebida vegetal à base de proteínas de ervilha e de arroz, passando por um processo de fermentação láctica com *L. rhamnosus* GG e adição de polpa de uvaia, e analisar seu potencial probiótico, prebiótico e antioxidante durante as etapas de digestão gastrointestinal.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Para elaboração da bebida foram utilizadas proteína isolada de arroz (80g proteínas 100g<sup>-1</sup>, VeganWay, Florianópolis, SC, Brasil) e proteína isolada de ervilha (80g proteínas 100g<sup>-1</sup>, VeganWay, Florianópolis, SC, Brasil), com cultura probiótica liofilizada composta por *Lactocaseibacillus rhamnosus* LGG® (Lr) (Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca) e polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*) (89,4% de umidade, 1,0% de proteína, 0,25% de gordura, 9,05% de carboidratos e 0,30% cinzas). Para as análises microbiológicas, foram utilizados caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e ágar MRS (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Para a simulação gastrointestinal *in vitro*, foram utilizadas enzimas  $\alpha$ -amilase (Sigma-Aldrich São Paulo, SP, Brasil), pepsina de mucosa gástrica suína (Sigma-Aldrich São Paulo, SP, Brasil), pancreatina suína (Sigma-Aldrich São Paulo, SP, Brasil) e sais biliares bovinos (Sigma-Aldrich São Paulo, SP, Brasil) (São Paulo, SP, Brasil). Para determinação da viabilidade das bactérias probióticas, foi utilizado o Kit BacTiter-Glo™ Viability (Promega, Madison, WI, EUA). Para análise do teor de fenólicos totais, foi utilizado reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Para análise da atividade antioxidante, segundo ensaio de captura de radicais DPPH, foram utilizados radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil); para análise da atividade de captura de radicais ABTS, foram utilizados 2,2-AZINO-BIS(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) e Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido-carboxílico) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil); e para análise segundo ensaio de redução do Ferro FRAP, foi utilizado TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Todos os produtos químicos usados eram de grau analítico.

### 2.2 ELABORAÇÃO DA BEBIDA

Na elaboração da bebida vegetal fermentada, foi utilizado 1,83% de proteína de arroz, 1,83% de proteína de ervilha, 10% de sacarose, 0,32% de óleo de soja e 0,2% de lecitina de soja diluídas em água destilada. A bebida foi homogeneizada a 13.000 rpm (Ultra-Turrax, IKA™ T25 digital) por 3 minutos, seguido de inoculação de uma cultura probiótica liofilizada composta por 10<sup>9</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama

de *Lactocaseibacillus rhamnosus* LGG® (Lr) (Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca). A etapa de fermentação foi realizada a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2$  até alcançar o pH de 4,8 e, posteriormente resfriada a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ . A bebida fermentada foi dividida em três amostras (CT, I5 e I10). Na amostra CT não houve adição de polpa de uvaia, enquanto as amostras I5 e I10 foram preparadas com adição de 5% e 10% (m/v) de polpa de uvaia pasteurizada ( $80^{\circ}\text{C}/3\text{min}$ ), respectivamente. As amostras foram mantidas refrigeradas ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) até o momento das análises.

### 2.3 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

A simulação gastrointestinal *in vitro* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Broadkorb *et al.* (2019) e Verruck *et al.* (2020), com modificações. O protocolo simulou a digestão na boca, estômago, intestino delgado e cólon, sequencialmente (Figura 1). Inicialmente, para simular as condições na boca, cinco gramas de cada amostra foram utilizados com adição de 1:1 (m/v) de fluido salivar simulado (SSF) (Tabela 1) e solução de  $\alpha$ -amilase salivar humana ( $75 \text{ U.mL}^{-1}$ ). A mistura foi incubada em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  com agitação a 150 rpm por 2 min. Em seguida, para simular as condições do estômago, foi misturado fluido gástrico simulado (SGF) (Tabela 1) 1:1 (v/v) pré-aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$  e o pH foi corrigido com HCl (pH 3,0). Em seguida, ainda na fase estomacal, adicionou-se solução de pepsina suína ( $2.000 \text{ U.mL}^{-1}$ ), incubadas novamente a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria, por 2 h sob agitação de 100 rpm.

Na fase de simulação do intestino delgado, foi adicionado 1:1 (v/v) de fluido intestinal simulado (SIF) (Tabela 1) previamente aquecido em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  contendo pancreatina ( $100 \text{ U.mL}^{-1}$ , baseada na atividade da tripsina) e sais de bile (10 mM). O pH foi ajustado para 7,0 com a adição de NaOH 1M. A solução foi agitada a 100 rpm, a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2h. Após passar pelo intestino delgado, o alimento chegou à etapa do intestino grosso, onde o ensaio foi adaptado para simular a atividade da microbiota intestinal segundo protocolo descrito por Verruck *et al.* (2020). O fluido do intestino grosso simulado (SLF) (Tabela 1) foi adicionado ao bolo do intestino delgado na proporção de 1:1 (v/v). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 M durante todo o tempo do ensaio das condições do intestino grosso. Durante essa etapa, a temperatura foi mantida em  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e a agitação também foi mantida a 45 rpm para simular a intensidade dos movimentos peristálticos.

Antes e durante a simulação, as soluções enzimáticas foram mantidas resfriadas e adicionadas gradualmente em cada etapa da digestão. A quantificação de *L. rhamnosus* GG, fenólicos totais e atividade antioxidante foram realizadas antes da simulação gastrointestinal,

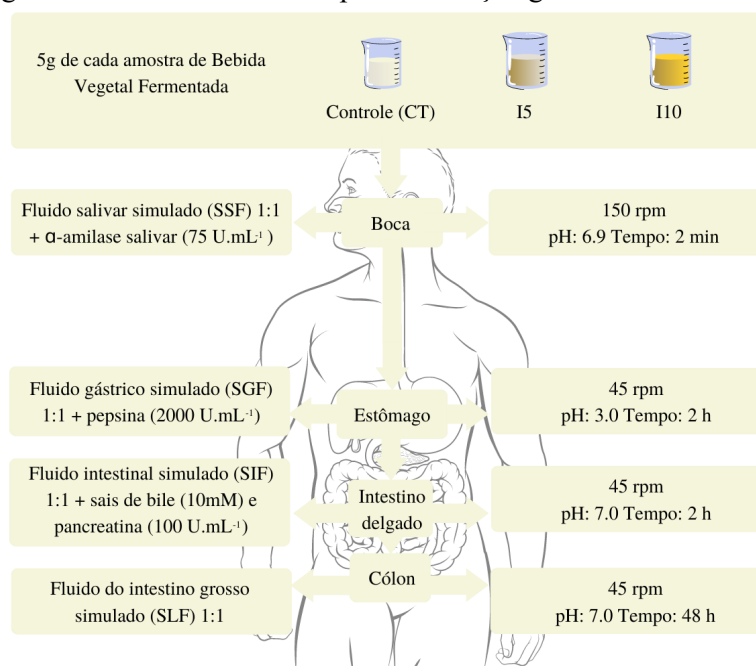
durante a fase oral, gástrica, do intestino delgado e durante a fase do intestino grosso nos tempos de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h (Figura 1).

Tabela 1 – Concentração de fluidos utilizados ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nas etapas de simulação gastrointestinal

	SSF pH 7	SGF pH 3	SIF pH 7	SLF pH 7
KCl	15,1	6,9	6,8	4,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,7	0,9	0,8	0,5
NaHCO <sub>3</sub>	13,6	25	85	1,5
NaCl	-	47,2	38,4	4,5
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,15	0,12	0,33	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,06	0,5	-	-
HCl	1,1	15,6	8,4	-
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	1,5	0,15	0,6	0,15
Peptona	-	-	-	5
Extrato Levedura	-	-	-	4,5
MgSO <sub>4</sub>	-	-	-	1,25
FeSO <sub>4</sub>	-	-	-	0,005
Amido	-	-	-	5
Pectina	-	-	-	2
Caseína	-	-	-	3
Cisteína	-	-	-	0,8
Tween 80	-	-	-	1
Triptona de Soja	-	-	-	5

SSF: Fluido salivar simulado; SGF: Fluido gástrico simulado; SIF: Fluido intestinal simulado; SLF: Fluido do intestino grosso simulado.

Figura 1 - Protocolo utilizado para simulação gastrointestinal *in vitro*



### 2.3.1 Análise microbiológica

O método de bioluminescência foi utilizado para quantificar o número de células viáveis de *L. rhamnosus* GG em cada etapa da simulação gastrointestinal. Foi realizada a diluição em série da cultura pura de *L. rhamnosus* GG em solução salina ( $0,85\text{g } 100\text{mL}^{-1}$ ) para construção da curva, bem como foi utilizado  $100\mu\text{L}$  de cada amostra, resultante das fases da simulação gastrointestinal, com  $50\mu\text{L}$  do reagente BacTiter-Glo™ e submetidos a um leitor de microplacas da Promega (GloMax® Explorer System modelo GM3500, EUA) para a obtenção dos valores de luminescência. Foi utilizada curva de calibração ( $R^2 = 0,9925$ ), construída através da correlação dos valores de luminescência e as contagens em placa. As contagens em placa foram obtidas através do método *pour plate* em ágar de Man, Rogosa e Sharp (MRS) incubadas em estufa bacteriológica a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 h e a contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* GG expressa em log de unidades formadoras de colônias por grama ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ). A análise foi realizada em triplicata, incluindo a propagação da bactéria probiótica para a construção da curva.

#### 2.3.1.1 Taxa de sobrevivência

Após as condições gastrointestinais simuladas, o desempenho de *L. rhamnosus* GG foi avaliado pela taxa de recuperação (%) (Verruck *et al.*, 2015) conforme a equação:

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100$$

onde  $N_1$  representa a contagem de células viáveis após cada fase da simulação gastrointestinal e  $N_0$  representa a contagem de células viáveis antes da simulação.

### 2.3.2 Teor de fenólicos totais (TPC)

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada conforme o método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). O método consiste na reação de  $0,5\text{mL}$  de Folin-Ciocalteu,  $7\text{mL}$  de água destilada,  $100\mu\text{L}$  de cada amostra e  $1,5\text{mL}$  de solução de carbonato de sódio a 20% p/v. Os tubos de ensaio, com as misturas, foram mantidos no escuro à temperatura ambiente ( $24^\circ\text{C}$ ) durante 120 minutos. As absorbâncias

foram medidas em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1240 Tokyo, Japão) a 765nm e os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por mL (mg Trolox.mL<sup>-1</sup>). A análise foi realizada em triplicata e água destilada foi utilizada para zerar o espectrofotômetro.

#### 2.3.2.1 Fração liberada de compostos fenólicos

Para avaliar a fração liberada (%) de conteúdo fenólico de cada fase da simulação gastrointestinal (boca, estômago, intestino delgado e cólon), a equação descrita por Arend *et al.*, 2022 foi aplicada:

$$\text{Fração liberada (\%)} = \frac{n_x}{n_i} \times 100$$

onde  $n_x$  representa o conteúdo quantificado após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas (mg.g<sup>-1</sup>) e  $n_i$  representa o conteúdo inicial quantificado antes da simulação.

### 2.3.3 Atividade antioxidante

#### 2.3.3.1 Ensaio de captura de radicais DPPH

O ensaio de captura de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizado conforme descrito por Rufino *et al.* (2007). O método consiste na reação de 0,1mL de cada amostra com 3,9mL do radical DPPH (solução DPPH 0,06mM). Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos e mantidos no escuro durante 30 minutos. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1240 Tokyo, Japão) a 515nm com curva de calibração ( $R^2 = 0,9861$ ) e os resultados foram expressos como equivalente de trolox por mL (mg.mL<sup>-1</sup>). A análise foi realizada em triplicata e álcool metílico foi utilizado como branco.

#### 2.3.3.2 Atividade de captura de radicais ABTS

A capacidade antioxidante pelo método ABTS foi realizada conforme descrito por Rufino *et al.* (2007). O método consiste na reação de 30μL da diluição de cada amostra com 3mL do radical ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt). Os tubos de ensaio, com as misturas, foram mantidos no escuro à temperatura ambiente

(24°C) durante 6 minutos. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1240 Tokyo, Japão) a 734nm com curva de calibração ( $R^2 = 0,9944$ ) e os resultados foram expressos como equivalente de trolox por mL (mg Trolox.mL<sup>-1</sup>). A análise foi realizada em triplicata e álcool etílico foi utilizado como branco.

#### 2.3.3.3 Ensaio de redução do Ferro FRAP

O método FRAP foi realizado conforme descrito por Rufino *et al.* (2006). O método consiste na reação de 90µL da diluição de cada amostra com 2,7mL do reagente FRAP (25mL de tampão acetato a 0,3M, 2,5mL de solução TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) a 10mM e 2,5mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20mM). Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos e mantidos no escuro durante 30 minutos. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1240 Tokyo, Japão) a 595nm e os resultados foram expressos em micromol de Trolox equivalente por mililitro da amostra (µM Trolox.mL<sup>-1</sup>). A análise foi realizada em triplicata e o reagente FRAP foi utilizado como branco.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para a determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados, foi utilizada análise de variância (ANOVA) one-way e teste de Tukey. A análise dos dados foi realizada no software STATISTICA versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 VIABILIDADE DE *L. rhamnosus* GG DURANTE A SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL

Após a simulação gastrointestinal, a contagem de células viáveis e a taxa de recuperação de *L. rhamnosus* GG nas amostras após as fases oral, gástrica e intestinal (íleo e cólon) são mostradas na Tabela 2 e na Figura 2, respectivamente. A adição de uvaia impactou significativamente a viabilidade do probiótico em todas as etapas da simulação gastrointestinal. As amostras iniciais quando comparadas às finais, apesar da significância estatística ( $p < 0,05$ ), não possuem relevância microbiológica (Pinto *et al.*, 2015), pois as variações foram de apenas 0,14 (amostra com 5% de polpa de uvaia) e 0,15 (amostra com 10% de polpa de uvaia) log UFC.g<sup>-1</sup>. Além disso, todas as amostras apresentaram alta contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* GG (>9 log UFC.g<sup>-1</sup>). Segundo Hussain *et al.* (2016), valores acima de 6 log UFC.g<sup>-1</sup> são suficientes para proporcionar efeitos benéficos ao organismo. Em ensaio clínico conduzido por Segers *et al.* (2014), a ingestão acima de 8 log UFC.g<sup>-1</sup> de *L. rhamnosus* GG reduziu a resposta inflamatória dos indivíduos.

Tabela 2 – Contagens de células viáveis de *L. rhamnosus* GG (log UFC.g<sup>-1</sup>) ao longo da passagem pelo sistema gastrointestinal simulado.

Amostra	CT	I5	I10
Inicial	9,30 ± 0,03 <sup>bDE</sup>	9,44 ± 0,01 <sup>aFG</sup>	9,45 ± 0,04 <sup>aC</sup>
Boca	9,49 ± 0,04 <sup>bEF</sup>	9,57 ± 0,02 <sup>aEF</sup>	9,55 ± 0,01 <sup>abC</sup>
Estômago	8,31 ± 0,13 <sup>bG</sup>	9,37 ± 0,05 <sup>aFG</sup>	9,40 ± 0,07 <sup>aC</sup>
Íleo	8,19 ± 0,09 <sup>bG</sup>	8,49 ± 0,14 <sup>aH</sup>	8,42 ± 0,01 <sup>abC</sup>
Colon 6h	11,09 ± 0,04 <sup>aA</sup>	10,79 ± 0,10 <sup>bAB</sup>	10,66 ± 0,03 <sup>bA</sup>
Colon 12 h	10,84 ± 0,17 <sup>aA</sup>	11,04 ± 0,04 <sup>aA</sup>	10,50 ± 0,02 <sup>bA</sup>
Colon 18 h	10,73 ± 0,07 <sup>aAB</sup>	10,59 ± 0,08 <sup>aBC</sup>	10,50 ± 0,02 <sup>bB</sup>
Colon 24 h	8,63 ± 0,03 <sup>bFG</sup>	9,17 ± 0,16 <sup>aG</sup>	8,46 ± 0,13 <sup>bE</sup>
Colon 30 h	9,24 ± 0,07 <sup>bDEF</sup>	9,82 ± 0,07 <sup>aDE</sup>	9,07 ± 0,04 <sup>bD</sup>
Colon 36 h	9,39 ± 0,02 <sup>aCDE</sup>	9,62 ± 0,16 <sup>aEF</sup>	9,04 ± 0,03 <sup>bD</sup>
Colon 42 h	9,91 ± 0,15 <sup>aCD</sup>	10,01 ± 0,19 <sup>aD</sup>	9,51 ± 0,10 <sup>aC</sup>
Colon 48 h	9,94 ± 0,02 <sup>abBC</sup>	10,37 ± 0,03 <sup>aC</sup>	9,66 ± 0,28 <sup>bC</sup>

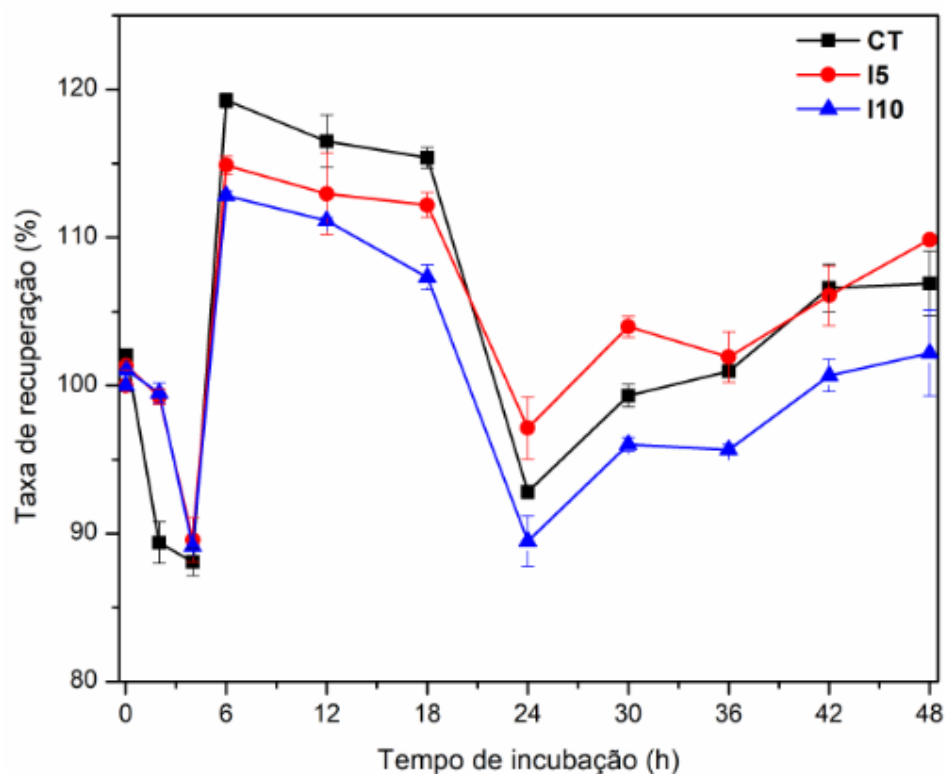
Resultados expressos em média ± desvio padrão.

<sup>a-g</sup> Letras minúsculas em uma mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as amostras na mesma etapa da simulação gastrointestinal

<sup>A-C</sup> Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) na amostra em etapas diferentes da simulação gastrointestinal..

Também não houve diferença significativa na taxa de recuperação de *L. rhamnosus* GG entre as amostras (CT, I5 e I10). Este resultado se deve a várias características da bebida ao longo da digestibilidade *in vitro*. Dentre elas, durante a fase oral, a bebida vegetal fica pouco tempo em contato com o fluido salivar simulado (SSF), devido a sua característica líquida e pouco viscosa, o que pode ter afetado a recuperação de *L. rhamnosus* GG. Além disso, durante a passagem pelo estômago (SGF) há a formação de complexos insolúveis entre proteínas (ervilha e arroz) e polissacarídeos (pectina presente na polpa de uvaia) (Mun *et al.*, 2020), que ajudam a criar uma barreira protetora, impedindo que a pepsina e os fluidos gástricos atinjam as células bacterianas e contribuindo para a manutenção de alta viabilidade da cultura probiótica. Na etapa de simulação do intestino delgado, os sais biliares presentes no SIF podem atuar com ação detergente sobre as membranas dos microrganismos (Nazo *et al.*, 2019), podendo acarretar na diminuição da taxa de recuperação.

Figura 2 – Taxa de recuperação (%) de *L. rhamnosus* GG durante a simulação das condições gastrointestinais *in vitro*



Fase oral (2min), Fase gástrica (2h), Fase ileal (4h), Fase intestinal (6h – 48h). Amostra controle (■); Amostra com 5% de polpa de uvaia (●); e amostra com 10% de polpa de uvaia (▲)



Por fim, durante a simulação do intestino grosso, devido a baixa acidez e a disponibilidade de substratos não absorvidos anteriormente, os microrganismos podem se multiplicar e exercer seus efeitos benéficos (Verruck *et al.*, 2019), e assim o fizeram até às 18h. Após as 18h de incubação, I10 apresentou menor taxa de recuperação ( $p < 0,05$ ) em relação a CT e I5, isso se deve ao fato da maior concentração de polpa de uvaia liberar grandes quantidades de compostos fenólicos (o que foi comprovado na análise de compostos fenólicos totais), levando a inibição do crescimento da bactéria probiótica. Nualkaekul *et al.* (2011), encontraram resultados semelhantes ao estudar a recuperação de *L. plantarum* e atribuíram a possível inibição devido aos altos teores de compostos fenólicos liberados pelos sucos de romã e cranberry. No intervalo entre 24h e 36h houve uma diminuição na taxa de recuperação, possivelmente pela necessidade de adaptação para o consumo de substratos não facilmente disponíveis, como proteínas de alta MM e frutooligossacarídeos. Ao final da digestibilidade *in vitro*, todas as contagens estavam altas ( $>9 \log \text{UFC.g}^{-1}$ ), esses resultados indicam que a matriz vegetal é uma alternativa promissora de carreamento de *L. rhamnosus* GG, porém a amostra I10, neste estudo, não pode ser considerada a melhor opção para carrear *L. rhamnosus* GG em bebida vegetal.

### 3.2 EFEITO DA DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* NO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Após a simulação gastrointestinal, a contagem e a fração liberada de teor de fenólicos totais (%) de teor de compostos fenólicos (TPC) nas amostras após as fases oral, gástrica e intestinal (íleo e cólon) são mostradas na Tabela 3 e Figura 3, respectivamente.

Todas as amostras apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos teores de fenólicos totais. O comportamento das amostras CT e I5, apesar de terem diferença estatística entre o teor final de fenólicos totais, mantiveram o mesmo comportamento (Figura 3), com maior TPC observado no íleo, diminuindo ligeiramente até o cólon 36h e retornando a aumentar até atingir o máximo de TPC no cólon 48h. Segundo Spínola *et al.* (2019) descreveram, a hidrólise ácida e enzimática, ocorridas principalmente nas fases estomacais e intestinais, liberam compostos fenólicos ligados a moléculas, como o açúcar, tornando-os disponíveis para serem metabolizados; o que sugere ter acontecido no presente estudo. Na amostra I10, o maior TPC é observado no cólon em 18h, com ligeira redução até o cólon 48h, mantendo o teor de fenólicos totais significativamente maior quando comparado às demais amostras.

Tabela 3 – Teores de compostos fenólicos totais (mg GAE.mL<sup>-1</sup>) ao longo da passagem pelo sistema gastrointestinal simulado.

Amostra	CT	I5	I10
Inicial	0,01 ± 0,00 <sup>eA</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>gA</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>dA</sup>
Boca	0,02 ± 0,00 <sup>eB</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>gB</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>dA</sup>
Estômago	0,08 ± 0,00 <sup>dB</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>fB</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>dA</sup>
Íleo	0,70 ± 0,01 <sup>aA</sup>	0,70 ± 0,02 <sup>aB</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>cB</sup>
Colon 6h	0,58 ± 0,01 <sup>bcB</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>dB</sup>	1,24 ± 0,02 <sup>bA</sup>
Colon 12 h	0,59 ± 0,01 <sup>bcB</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>bB</sup>	1,33 ± 0,04 <sup>abA</sup>
Colon 18 h	0,60 ± 0,05 <sup>bcB</sup>	0,63 ± 0,01 <sup>bB</sup>	1,40 ± 0,03 <sup>aA</sup>
Colon 24 h	0,58 ± 0,01 <sup>bcB</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>dB</sup>	1,32 ± 0,01 <sup>abA</sup>
Colon 30 h	0,58 ± 0,01 <sup>bcB</sup>	0,56 ± 0,00 <sup>deB</sup>	1,31 ± 0,06 <sup>abA</sup>
Colon 36 h	0,55 ± 0,00 <sup>cB</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>cdB</sup>	1,24 ± 0,05 <sup>bA</sup>
Colon 42 h	0,60 ± 0,01 <sup>bcB</sup>	0,58 ± 0,00 <sup>cdB</sup>	1,24 ± 0,03 <sup>bA</sup>
Colon 48 h	0,61 ± 0,01 <sup>bB</sup>	0,64 ± 0,05 <sup>cC</sup>	1,29 ± 0,04 <sup>bA</sup>

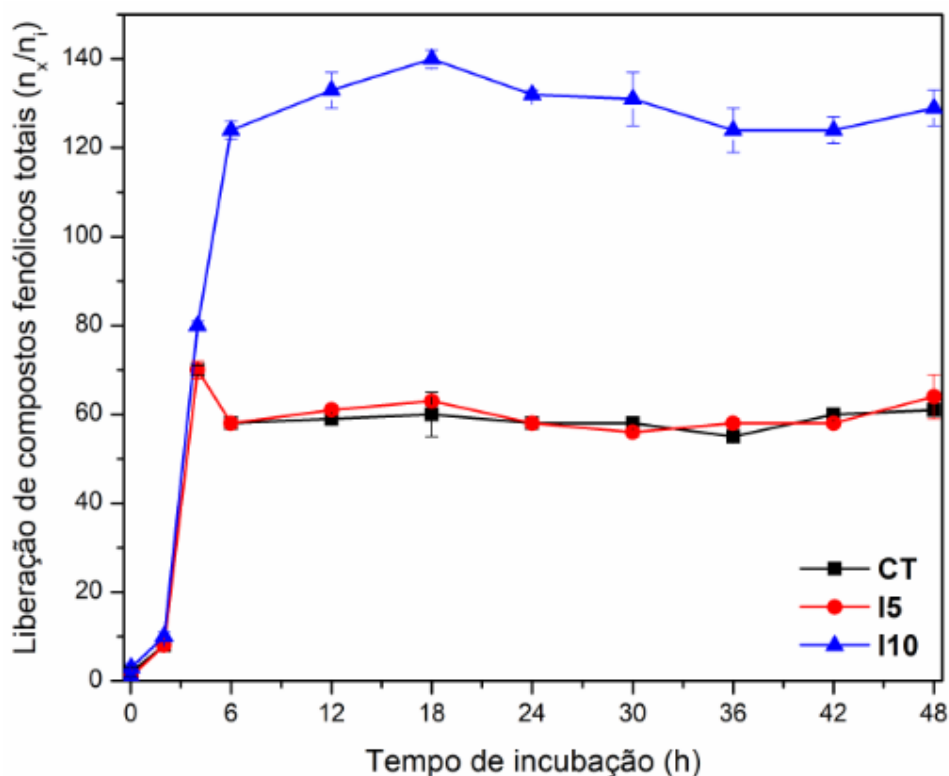
<sup>a-g</sup> Letras minúsculas em uma mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para a mesma amostra entre as etapas.

<sup>A-C</sup> Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as amostras em uma mesma etapa.

Como no cólon há maior multiplicação de bactérias, observada na contagem de células viáveis (Tabela 3), ocorrem também liberações e transformações nos compostos fenólicos (Morais *et al.*, 2019), o que explica o aumento progressivo ao longo da digestibilidade *in vitro*, principalmente em I10 (Figura 3).

De acordo com Farias *et al.* (2020), vários compostos fenólicos foram identificados na polpa de uvaia, dentre eles 10 flavonoides e 7 ácidos fenólicos, onde todos os flavonóides aumentaram sua intensidade relativa após a digestibilidade *in vitro* na fase intestinal, exceto galocatequina, enquanto que os ácidos fenólicos reduziram durante a mesma fase. Estudos sugerem que os flavonoides podem ser importantes para a saúde cardiometabólica, função cognitiva, doença de Parkinson e alguns tipos de cânceres (Cassidy *et al.*, 2016). Esses achados de teor de compostos fenólicos, podem estar diretamente relacionados com a atividade antioxidante da bebida vegetal fermentada, visto que com alto teor de fenólicos, espera-se que a atividade antioxidante também seja alta (Haminiuk *et al.*, 2012).

Figura 3 - Fração liberada de Teor de Fenólicos totais



Fase oral (2min), Fase gástrica (2h), Fase ileal (4h), Fase intestinal (6h – 48h). Amostra controle (■); Amostra com 5% de polpa de uvaia (●); e amostra com 10% de polpa de uvaia (▲). Onde  $n_x$  representa o conteúdo quantificado após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e  $n_i$  representa o conteúdo inicial quantificado antes da simulação.

### 3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA DURANTE A SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL

Após a simulação gastrointestinal, a atividade antioxidante (AA) nas amostras após as fases oral, gástrica e intestinal (íleo e cólon) foram analisadas segundo o método DPPH, ABTS e FRAP, mostradas nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. Todas as amostras, segundo o método DPPH (Tabela 4), apresentaram aumento de AA significativo ( $P < 0,05$ ) ao longo dos processos da digestibilidade *in vitro*, atingindo valores máximos no cólon 48h. O comportamento foi similar entre as amostras, com aumento gradual da AA até a fase do íleo, com expressivo aumento quando permanecem 6h no cólon, diminuindo em seguida até o cólon 30h (CT), 42h (I5) e 36h (I10), e retornando a aumentar a AA até atingirem o máximo em 48h no cólon. Esse aumento observado quando as amostras atingem o cólon descendente, deve-se à interação com a microbiota intestinal e liberação de compostos com maior AA (Arend *et al.*, 2022). Além da presença de compostos fenólicos na polpa de uvaia, o aumento

da AA pode ser explicado devido a formação de peptídeos bioativos com atividade antioxidante durante a digestão da bebida fermentada (Rutella *et al.*, 2016). A hidrólise de proteínas é capaz de produzir aminoácidos antioxidantes contribuindo para o aumento da AA (Chugh *et al.*, 2020). Taniguchi *et al.* (2017) descreveu que o hidrolisado da fração globulina da proteína de arroz apresentou um peptídeo (YLAGMN) com AA. Além disso, os frutos de uvaia são uma fonte rica de vitamina C, uma importante molécula antioxidante, variando entre 9,45 e 122,51mg 100g<sup>-1</sup> (da Silva *et al.*, 2022) e em carotenoides, variando entre 1,3 e 441,26mg 100g<sup>-1</sup> (Sganzerla *et al.*, 2019). Analisando as amostras CT, I5 e I10 houve diferença significativa no aumento da atividade antioxidante, demonstrando que a adição de polpa de uvaia na bebida vegetal fermentada pode ser uma ótima estratégia para incremento funcional de bebidas vegetais fermentadas.

Tabela 4 – Capacidade antioxidante segundo método DPPH (mg Trolox.mL<sup>-1</sup>) ao longo da passagem pelo sistema gastrointestinal simulado.

Amostra	CT	I5	I10
Inicial	0,22 ± 0,00 <sup>iB</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>iAB</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>gA</sup>
Boca	0,44 ± 0,00 <sup>hB</sup>	0,45 ± 0,00 <sup>hA</sup>	0,46 ± 0,00 <sup>gA</sup>
Estômago	0,87 ± 0,00 <sup>gB</sup>	0,89 ± 0,00 <sup>gA</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>fA</sup>
Íleo	1,70 ± 0,03 <sup>fB</sup>	1,81 ± 0,00 <sup>fA</sup>	1,83 ± 0,01 <sup>eA</sup>
Colon 6h	3,91 ± 0,02 <sup>cC</sup>	4,04 ± 0,03 <sup>abB</sup>	8,04 ± 0,02 <sup>bcA</sup>
Colon 12 h	3,85 ± 0,01 <sup>cdC</sup>	3,98 ± 0,01 <sup>abB</sup>	7,86 ± 0,08 <sup>cdA</sup>
Colon 18 h	3,67 ± 0,02 <sup>eB</sup>	3,72 ± 0,05 <sup>eB</sup>	7,75 ± 0,07 <sup>cdA</sup>
Colon 24 h	3,78 ± 0,02 <sup>dB</sup>	3,87 ± 0,01 <sup>dB</sup>	7,80 ± 0,25 <sup>cdA</sup>
Colon 30 h	3,87 ± 0,03 <sup>cdB</sup>	3,93 ± 0,03 <sup>bcdB</sup>	7,88 ± 0,02 <sup>cdA</sup>
Colon 36 h	3,97 ± 0,07 <sup>bcB</sup>	3,93 ± 0,04 <sup>bcdB</sup>	7,96 ± 0,07 <sup>cdA</sup>
Colon 42 h	4,02 ± 0,06 <sup>abB</sup>	3,89 ± 0,02 <sup>cdB</sup>	8,23 ± 0,14 <sup>abA</sup>
Colon 48 h	4,06 ± 0,07 <sup>abB</sup>	3,96 ± 0,05 <sup>abcB</sup>	8,44 ± 0,00 <sup>aA</sup>

<sup>a-g</sup> Letras minúsculas em uma mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para a mesma amostra entre as etapas.

<sup>A-C</sup> Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as amostras em uma mesma etapa.

Segundo o método ABTS (Tabela 5), todas as amostras apresentaram aumento na AA em todas as etapas da digestibilidade *in vitro* ( $p < 0,05$ ), com a obtenção do valor máximo no cólon 48h. Esses valores máximos foram estatisticamente muito superiores aos valores iniciais, porém, quando analisados os resultados máximos entre as amostras (CT, I5 e I10), CT e I5 não apresentaram diferenças estatísticas, enquanto as amostras I5 e I10 também não. Logo, os resultados demonstraram que a polpa de uvaia tem potencial antioxidante, quando adicionada em valores iguais ou superiores a 10% na bebida vegetal fermentada pelo método

de captura do radical ABTS. Além disso, os métodos DPPH e ABTS possuem afinidades com diferentes compostos antioxidantes; enquanto o DPPH reage com os polares, o método ABTS reage com os compostos apolares (Capocasa *et al.*, 2008). Essas diferenças nas afinidades químicas, pode resultar em atividade antioxidante distinta entre os métodos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2006), como observado neste trabalho.

Tabela 5 – Capacidade antioxidante segundo método ABTS (mg Trolox.mL<sup>-1</sup>) ao longo da passagem pelo sistema gastrointestinal simulado.

Amostra	CT	I5	I10
Inicial	0,02 ± 0,00 <sup>dC</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>fB</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>fA</sup>
Boca	0,04 ± 0,00 <sup>dC</sup>	0,29 ± 0,00 <sup>fB</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>fA</sup>
Estômago	0,14 ± 0,00 <sup>dB</sup>	0,46 ± 0,00 <sup>fA</sup>	0,35 ± 0,08 <sup>fA</sup>
Íleo	0,72 ± 0,02 <sup>dB</sup>	2,81 ± 0,21 <sup>eB</sup>	3,16 ± 0,02 <sup>eA</sup>
Colon 6h	7,36 ± 0,45 <sup>cA</sup>	6,81 ± 0,09 <sup>dAB</sup>	6,07 ± 0,37 <sup>dB</sup>
Colon 12 h	7,73 ± 0,28 <sup>bcA</sup>	6,62 ± 0,30 <sup>dA</sup>	6,01 ± 0,32 <sup>dA</sup>
Colon 18 h	8,79 ± 0,42 <sup>bB</sup>	8,39 ± 0,47 <sup>cAB</sup>	9,65 ± 0,44 <sup>cA</sup>
Colon 24 h	10,38 ± 0,36 <sup>aA</sup>	9,38 ± 0,28 <sup>bB</sup>	10,47 ± 0,03 <sup>bcA</sup>
Colon 30 h	10,37 ± 0,41 <sup>aA</sup>	10,31 ± 0,12 <sup>aA</sup>	11,39 ± 0,16 <sup>aA</sup>
Colon 36 h	10,42 ± 0,03 <sup>aC</sup>	11,01 ± 0,20 <sup>aB</sup>	11,51 ± 0,00 <sup>aA</sup>
Colon 42 h	10,14 ± 0,60 <sup>aA</sup>	11,18 ± 0,36 <sup>aA</sup>	11,75 ± 0,11 <sup>aA</sup>
Colon 48 h	10,28 ± 0,57 <sup>aB</sup>	11,06 ± 0,04 <sup>aAB</sup>	11,97 ± 0,17 <sup>aA</sup>

<sup>a-f</sup> Letras minúsculas em uma mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para a mesma amostra entre as etapas.

<sup>A-C</sup> Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as amostras em uma mesma etapa.

Diferentemente dos métodos DPPH e ABTS que quantificam a atividade antioxidante através da doação de átomos de hidrogênio, estabilizando os radicais, o método FRAP (Tabela 6), analisa as amostras através da transferência de elétrons para a solução contendo Fe<sup>2+</sup>, que forma um complexo com o TPTZ (Sganzerla *et al.*, 2019). Analisar esses três métodos é uma forma de melhor qualificar e quantificar a AA de um produto, visto que muitos são os compostos responsáveis pela sua capacidade antioxidante. Pelo método FRAP, todas as amostras também apresentaram aumento gradativo desde o início da digestibilidade *in vitro* até atingirem seus valores máximos de atividade antioxidante no cólon em 48h. Assim como nos métodos DPPH e ABTS, também foi observado um aumento substancial na AA quando chega na etapa do cólon, já explicado anteriormente pela sua interação com a microbiota intestinal, neste caso representado por *L. rhamnosus* GG, que pode ter ação liberadora de moléculas com AA no produto. Em especial para a amostra com 10% de adição de polpa de uvaia, o valor final da digestibilidade *in vitro* foi mais que o dobro quando

comparado a amostra 0% e 5% (que não tiveram diferença significativa). Assim como ocorreu no presente estudo, Sganzerla *et al.* (2019) relataram alta correlação entre compostos bioativos com a AA na polpa da uvaia. Esse resultado é animador e demonstra que a adição de polpa de uvaia em bebidas vegetais fermentadas pode aumentar sua capacidade antioxidante, auxiliando na melhora da qualidade funcional.

Tabela 6 – Capacidade antioxidante segundo método FRAP (uMol Trolox.mL<sup>-1</sup>) ao longo da passagem pelo sistema gastrointestinal simulado.

Amostra	CT	I5	I10
Inicial	15,80 ± 2,94 <sup>gC</sup>	27,65 ± 1,34 <sup>hB</sup>	36,75 ± 1,22 <sup>fA</sup>
Boca	28,86 ± 0,89 <sup>gC</sup>	58,27 ± 2,71 <sup>hiB</sup>	70,77 ± 0,96 <sup>fA</sup>
Estômago	57,03 ± 7,62 <sup>gC</sup>	112,85 ± 7,77 <sup>hB</sup>	148,08 ± 5,99 <sup>fA</sup>
Íleo	243,95 ± 7,44 <sup>fb</sup>	296,70 ± 40,42 <sup>gAB</sup>	306,90 ± 14,89 <sup>eA</sup>
Colon 6h	498,15 ± 28,88 <sup>eB</sup>	502,53 ± 25,03 <sup>fb</sup>	1354,17 ± 43,50 <sup>dA</sup>
Colon 12 h	507,66 ± 6,73 <sup>eB</sup>	605,36 ± 13,04 <sup>eB</sup>	1457,15 ± 111,20 <sup>dA</sup>
Colon 18 h	594,49 ± 25,05 <sup>dC</sup>	786,11 ± 25,21 <sup>cB</sup>	1666,13 ± 62,32 <sup>cA</sup>
Colon 24 h	753,94 ± 28,39 <sup>cB</sup>	685,24 ± 39,18 <sup>dB</sup>	1814,11 ± 27,12 <sup>bA</sup>
Colon 30 h	794,41 ± 24,40 <sup>bcB</sup>	785,80 ± 11,22 <sup>cB</sup>	1903,20 ± 52,81 <sup>abA</sup>
Colon 36 h	832,46 ± 50,44 <sup>bB</sup>	866,29 ± 6,02 <sup>bB</sup>	1740,12 ± 56,52 <sup>bcA</sup>
Colon 42 h	819,63 ± 38,54 <sup>bC</sup>	992,52 ± 34,35 <sup>abB</sup>	1874,21 ± 30,37 <sup>abA</sup>
Colon 48 h	917,02 ± 14,98 <sup>aB</sup>	863,87 ± 0,21 <sup>bB</sup>	1983,23 ± 37,28 <sup>aA</sup>

<sup>a-g</sup> Letras minúsculas em uma mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,05) para a mesma amostra entre as etapas.

<sup>A-C</sup> Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística (P < 0,05) entre as amostras em uma mesma etapa.

## 4 CONCLUSÃO

Todas as amostras apresentaram altas concentrações de células viáveis e foram consideradas probióticas ( $> 9 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ), demonstrando que a matriz proteica de arroz e ervilha é adequada para o carreamento da cepa *L. rhamnosus* GG. As amostras I5 e I10 demonstraram alta atividade antioxidante ao final da digestibilidade *in vitro*, demonstrando que a adição de uvaia é relevante e interessante para a elaboração de bebidas vegetais, melhorando suas qualidades nutricionais. Além disso, a adição de uvaia também aumentou o conteúdo de fenólicos totais, sugerindo o aumento da capacidade prebiótica da bebida. Por fim, este trabalho demonstrou que novas alternativas de bebidas podem ser exploradas pela indústria de alimentos contendo a matriz estudada e a polpa de uvaia, sendo opção ao consumo de bebidas de origem animal.

## REFERÊNCIAS

- ALCORTA, A. et al. Foods for Plant-Based Diets: Challenges and Innovations. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 293, 1 fev. 2021.
- AREND, G. D. et al. Gravitational and microwave-assisted multi-stages block freeze concentration process to obtain enriched concentrated beet (*Beta vulgaris* L.) by-products extract: bioactive compounds and simulated gastrointestinal profile. **Food and Bioprocess Processing**, v. 133, p. 77–86, maio 2022.
- ASCHEMANN-WITZEL, J. et al. Plant-based food and protein trend from a business perspective: Markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 18, p. 1–10, 13 jul. 2020.
- BIANCHINI, C. B. et al. Incorporation of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) pulp in yogurt: A promising application in the lactose-free dairy product market. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 10, 10 ago. 2020.
- BOUKID, F.; ROSELL, C. M.; CASTELLARI, M. Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re)formulate innovative foods and beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 729–742, abr. 2021.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, 18 mar. 2019.
- CAPOCASA, F. et al. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 872–878, 15 dez. 2008.
- CASSIDY, A.; MINIHANE, A.-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 10–22, 23 nov. 2016.
- CHUGH, B.; KAMAL-ELDIN, A. Bioactive Compounds Produced by Probiotics in Food Products. **Current Opinion in Food Science**, fev. 2020.
- DA SILVA, A. P. G. et al. Chemical composition, bioactive compounds, and perspectives for the industrial formulation of health products from uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess – Myrtaceae): A comprehensive review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, p. 104500, jun. 2022.
- DA SILVA, A. P. G. et al. Chemical composition, nutritional value and bioactive compounds in six uvaia accessions. **Food Chemistry**, v. 294, p. 547–556, out. 2019.
- DE PAULO FARIAS, D. et al. Effect of *in vitro* digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in fractions of *Eugenia pyriformis* fruit. **Food Research International**, v. 150, p. 110767, dez. 2021.
- FARIAS, D. DE P. et al. Distribution of nutrients and functional potential in fractions of *Eugenia pyriformis*: An underutilized native Brazilian fruit. **Food Research International**, v. 137, p. 109522, nov. 2020.



GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, 14 jun. 2017.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2862–2866, 24 jun. 2012.

HERTZLER, S. R. et al. Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3704, 30 nov. 2020.

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**, v. 65, p. 371–380, 2016.

JAEKEL, L. Z. *et al.* Avaliação físico-química e sensorial de bebidas com diferentes proporções de extratos de soja e de arroz. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campinas**, v. 30, n. 2, 2010.

LAM, A. C. Y. *et al.* Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. **Food Reviews International**, 2018.

LAVEFVE, L.; MARASINI, D.; CARBONERO, F. Microbial Ecology of Fermented Vegetables and Non-Alcoholic Drinks and Current Knowledge on Their Impact on Human Health. **Advances in Food and Nutrition Research**, p. 147–185, 2019.

LOPES, J. M. M. et al. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. **Food Research International**, v. 105, p. 563–569, mar. 2018.

LU, Z. X. et al. Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 15, p. 2593–2605, 20 ago. 2019.

MASIÁ, C. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on Physicochemical Properties of Fermented Plant-Based Raw Materials. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 573, 10 mar. 2021.

MASIÁ, C.; JENSEN, P. E.; BULDO, P. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on Physicochemical Properties of Fermented Plant-Based Raw Materials. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1182, 26 ago. 2020.

MCCLEMENTS, D. J. Development of Next-Generation Nutritionally Fortified Plant-Based Milk Substitutes: Structural Design Principles. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 421, 3 abr. 2020.

MORAIS, S. G. G. et al. Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp. **Food Research International**, v. 126, p. 108681, dez. 2019.

NOAD, R. L. et al. Beneficial effect of a polyphenol-rich diet on cardiovascular risk: a randomised control trial. **Heart**, v. 102, n. 17, p. 1371–1379, 10 maio 2016.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, ago. 2006.

PIMENTEL, T. C. Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, v. 140, p. 110033, 1 fev. 2021.

PINTO, S. S. *et al.* Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400–408, 2015.

PUA, A. *et al.* Ingredients, Processing, and Fermentation: Addressing the Organoleptic Boundaries of Plant-Based Dairy Analogues. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 875, 18 mar. 2022.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) residue as a source of antioxidants: An approach to ecofriendly extraction. **LWT-- Food Science and Technology**, v. 138, p. 110785, 2021.

RUFINO *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007, v. 127, julho 2007.

RUFINO, M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 128, julho 2007.

RUFINO, M *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro FRAP. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 125, dez. 2006.

RUTELLA, G. S.; TAGLIAZUCCHI, D.; SOLIERI, L. Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bi-functional dairy food. **Food Microbiology**, v. 60, p. 54–61, dez. 2016.

SEGERS, M. E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. **Microbial Cell Factories**, v. 13, 2014.

SGANZERLA, W. G. *et al.* Geographical discrimination of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 15, p. 6778–6787, 30 set. 2019.

SGANZERLA, W. G. *et al.* Variability in the molecular, phenological, and physicochemical characteristics of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess - Myrtaceae) accessions from the Brazilian Atlantic rainforest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102082, ago. 2021.

SINGLETON, V; ROSSI, J. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticultura**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SPÍNOLA, V. et al. Changes in the phenolic compositions of *Elaeagnus umbellata* and *Sambucus lanceolata* after *in vitro* gastrointestinal digestion and evaluation of their potential anti-diabetic properties. **Food Research International**, v. 122, p. 283–294, ago. 2019.

TAMANG, J. P. et al. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 26 abr. 2016.

TANIGUCHI, M.; OCHIAI, A. Characterization and production of multifunctional cationic peptides derived from rice proteins. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 634–650, 19 jan. 2017.

VERNI, M. *et al.*, Design and characterization of a novel fermented beverage from lentil grains. **Foods**, v. 9, n. 7, 2020.

VERRUCK, S. et al. Evaluation of the interaction between microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 added in goat's milk Frozen Yogurt and *Escherichia coli* in the large intestine. **Food Research International**, v. 127, p. 108690, jan. 2020.

VERRUCK, S. *et al.* The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1179-1183, 2015.

QAMAR, S. et al. Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2742–2762, 3 set. 2019.

ZHAO, H. et al. Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 4, abr. 2020.