



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

LAILSON OLIVEIRA DE SOUSA

**EFEITO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA DE INGREDIENTES  
PROTEICOS NA VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS**

CAMPINAS

2025

**LAILSON OLIVEIRA DE SOUSA**

**EFEITO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA DE INGREDIENTES  
PROTEICOS NA VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para  
a obtenção do título de Mestre em  
Tecnologia de Alimentos.

**Orientador: Mirna Lúcia Gigante**

**ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
PELO ALUNO LAILSON OLIVEIRA DE SOUSA,  
E ORIENTADO  
PELA PROFA. DRA. MIRNA LÚCIA GIGANTE**

Campinas  
2025

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

So85e Sousa, Lailson Oliveira de, 2000-  
Efeito da digestão gastrointestinal simulada de ingredientes proteicos na  
viabilidade de microrganismos probióticos / Lailson Oliveira de Sousa. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas  
(UNICAMP), Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Probióticos. 2. Digestão gastrointestinal. 3. Hidrolisados proteicos. I.  
Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações complementares

**Título em outro idioma:** Effect of simulated gastrointestinal digestion of protein  
ingredients on the viability of probiotic microorganism

**Palavras-chave em inglês:**

Probiotics

Gastrointestinal digestion

Protein hydrolysates

**Área de concentração:** Tecnologia de Alimentos

**Titulação:** Mestre em Tecnologia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Mirna Lúcia Gigante [Orientador]

Flávia Maria Netto

Karina da Silva Chaves

**Data de defesa:** 06-03-2025

**Programa de Pós-Graduação:** Tecnologia de Alimentos

**Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)**

ODS: 3. Saúde e bem-estar

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1931-3739>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7199366413411447>

**Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante**

**Profa. Dra. Flavia Maria Netto**

**Profa. Dra. Karina da Silva Chaves**

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós- Graduação.

*Dedico esta dissertação à memória do meu pai, Alberto de Sousa, cuja sabedoria, dedicação e amor incondicional sempre me inspiraram. Embora sua presença física me falte, carrego comigo os valores que me ensinou e a força de suas palavras, que continuam a guiar meus passos. Esta conquista é também sua, pai!*

*“No coração da ciência existe um equilíbrio essencial entre duas atitudes aparentemente contraditórias: uma abertura para ideias novas, por mais bizarras ou contrárias à intuição que sejam, e o exame cético mais implacável de todas as ideias, antigas e novas. É assim que verdades profundas são separadas de disparates profundos.”*

*(Carl Sagan)*

## AGRADECIMENTOS

Às vezes, as palavras são insuficientes para expressar a gratidão que sentimos, mas é com elas que inicio esta jornada de agradecimentos, reconhecendo as contribuições que tornaram este trabalho possível.

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me dado a oportunidade de viver e aproveitar ao máximo essa experiência transformadora na pós-graduação. A Ele dedico toda a gratidão por me guiar e iluminar meu caminho durante essa árdua jornada.

À minha orientadora, Dra. Mirna Lúcia Gigante, registro meu mais profundo agradecimento pelo incentivo contínuo ao longo do mestrado. Suas orientações, paciência e dedicação foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional. Cada reunião e conversa foi um aprendizado que certamente marcará toda a minha trajetória, sinto-me profundamente agradecido por ter sido orientado por umas das melhores profissionais da área de leite do Brasil.

Agradeço também à Dra. Débora Baptista, por todo o suporte e ensinamentos durante essa caminhada, e à Dra. Aline Lopes, cuja generosidade em compartilhar conhecimento nas inúmeras horas dedicadas à microbiologia fez toda a diferença. Seu empenho em esclarecer minhas dúvidas e seu entusiasmo pela ciência me inspiram e me guiarão por toda a vida.

Agradeço ao meu pai, Alberto de Sousa (*in memoriam*), presto minha homenagem e gratidão. Apesar de não estar presente neste momento tão especial, seu exemplo de vida, força e determinação foi e sempre será a minha maior inspiração. Sem sua influência, não teria chegado até aqui.

A minha mãe, Auzely de Oliveira, minha gratidão eterna. Que apesar da distância física me ensinou que nenhuma dificuldade é insuperável e que, mesmo diante dos momentos mais desafiadores, há sempre uma razão para seguir em frente. Seu apoio e sua força me sustentaram e moldaram quem sou hoje. Grande parte dessa conquista pertence a você, uma minha mulher incrível e exemplo de resiliência.

Agradeço à minha amiga Laís Firmino, cuja presença foi fundamental ao longo de toda esta jornada. Cada abraço acolhedor, cada palavra de apoio e até mesmo cada lágrima compartilhada tiveram um significado profundo e uma importância incalculável para mim. Sua amizade e dedicação foram fontes constantes de força e motivação, e sem dúvida, tornaram esse percurso mais leve e significativo. Agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos, com seu carinho e compreensão, tornando essa caminhada ainda mais especial.

Aos meus queridos amigos e irmãos de laboratório, presentes em minha trajetória em Campinas – Kivea Paiva, Amanda Carmo, Thelissia Rodrigues, Sidmara Malagodi e Nathan

Noguera, expressei meu mais profundo e sincero agradecimento. Juntos, compartilhamos momentos de alegria, enfrentamos desafios e celebramos conquistas. A amizade que cultivamos ao longo dessa jornada é um tesouro que levarei comigo para toda a vida. A cada um de vocês, minha gratidão por fazerem parte de uma fase tão especial e transformadora.

Por fim, gostaria de expressar minha profunda gratidão à Universidade Estadual de Campinas, à Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço a oportunidade de desenvolver este trabalho em um ambiente acadêmico enriquecedor, repleto de profissionais dedicados e recursos de excelência. O apoio institucional, financeiro e intelectual que recebi ao longo dessa jornada foi fundamental para a realização deste estudo e para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Sem o respaldo dessas importantes instituições, este trabalho não teria sido possível.

A todos vocês, meu muito obrigado! Essa conquista é fruto do esforço coletivo, do apoio recebido e dos laços construídos ao longo dessa caminhada.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## RESUMO

Ingredientes proteicos vegetais tem sido utilizado por suas alegações de saúde e sustentabilidade. No entanto, apesar do aumento de consumo, ainda faltam estudos sobre como esses ingredientes afetam a microbiota intestinal. Compreender essa relação é crucial, pois a microbiota desempenha um papel vital na saúde geral. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito prebiótico do digerido de caseinato de cálcio (CC), isolado proteico de soro (IPS), concentrado proteico de ervilha (CPE) e isolado proteico de soja (IPSO) no crescimento de microrganismos probióticos após a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*. Dispersões proteicas com uma concentração de 10% foram feitas em água Milli-Q e submetidas à digestão gastrointestinal *in vitro* conforme protocolo INFOGEST com modificações. Após a digestão, as amostras foram centrifugadas (4000xg por 30 minutos a 4°C) e o sobrenadante ultrafiltrado (corte de 3 kDa) e o digerido avaliado como fonte prebiótica para o crescimento de culturas puras de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactocaseibacillus casei* e *Lactocaseibacillus rhamnosus*. As culturas foram inoculadas (2 % v/v) em caldo MRS suplementado (controle 1), caldo MRS suplementado com 2% do branco da digestão, caldo MRS suplementado mais 2% de fruto-oligossacarídeo (controle 2) ou com 2% de digerido de cada fonte proteica obtidos após digestão. O crescimento dos microrganismos foi avaliado por turbidimetria a 660nm (OD660) e por contagem padrão em placas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 e 48 horas, com os resultados expressos em log unidade formadora de colônia por mL (log UFC/mL). Houve interação significativa tanto no tempo de incubação como nos tratamentos utilizados como fonte prebiótica. Para o meio de cultura contendo os digeridos de proteínas lácteas os valores encontrados foram significativamente superiores quando comparado ao meio suplementado com FOS. Para o meio contendo os digeridos de proteínas vegetais (CPE e IPSO), os valores foram inferiores estatisticamente quando comparadas as proteínas lácteas e ao FOS, entretanto são superiores quando comparados aos controles (MRS padrão) para todos os microrganismos. Em termos gerais, as atividades antioxidantes dos digeridos vegetais (CPE e IPSO) foram superiores pelos métodos de DPPH, FRAP e ORAC em relação aos digeridos lácteos. Desta forma é possível concluir que as proteínas lácteas apresentam resultados superiores no crescimento de probióticos, entretanto estudos futuros são necessários para investigar os impactos das proteínas vegetais na composição e na função da microbiota intestinal.

**Palavras-chave:** Probióticos; Digestão gastrointestinal; hidrolisados proteicos.

## ABSTRACT

Plant-based protein ingredients have been used due to their health and sustainability claims. However, despite increased consumption, there is still a lack of studies on how these ingredients affect the gut microbiota. Understanding this relationship is crucial, as the microbiota plays a vital role in overall health. This study aimed to evaluate the prebiotic effect of digested calcium caseinate (CC), whey protein isolate (WPI), pea protein concentrate (PPC), and soy protein isolate (SPI) on the growth of probiotic microorganisms following in vitro simulated gastrointestinal digestion. Protein dispersions at a 10% concentration were prepared in Milli-Q water and subjected to in vitro gastrointestinal digestion following the INFOGEST protocol with modifications. After digestion, the samples were centrifuged (4000×g for 30 minutes at 4°C), and the supernatant was ultrafiltered (3 kDa cut-off). The digests were then evaluated as a prebiotic source for the growth of pure cultures of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactocaseibacillus casei*, and *Lactocaseibacillus rhamnosus*. The cultures were inoculated (2% v/v) in MRS broth supplemented with either no additives (control 1), 2% digestion blank, 2% fructooligosaccharide (control 2), or 2% of each protein digest obtained post-digestion. Microbial growth was evaluated by turbidimetry at 660 nm (OD<sub>660</sub>) and by standard plate counting at 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, and 48 hours, with results expressed as log colony-forming units per mL (log CFU/mL). There was a significant interaction between incubation time and the type of treatment used as the prebiotic source. For media containing dairy protein digests, the values were significantly higher compared to the medium supplemented with FOS. For media containing plant protein digests (PPC and SPI), the values were statistically lower than those for dairy proteins and FOS, yet higher than the controls (standard MRS) for all microorganisms tested. Overall, the antioxidant activities of the plant digests (PPC and SPI) were higher, as measured by DPPH, FRAP, and ORAC assays, compared to the dairy digests. Thus, it can be concluded that dairy proteins yield superior results for probiotic growth; however, further studies are necessary to investigate the impact of plant proteins on the composition and function of the gut microbiota.

Keywords: Probiotics; Gastrointestinal digestion; Protein hydrolysates.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Objetivo e esquema geral do trabalho.....	31
<b>Figura 2.</b> Agitador rotativo para tubos Falcon (Criemaq C-385).....	33
<b>Figura 3.</b> Contagem padrão em placas, utilizando o método de plaqueamento em gotas (Drop plate) dos microrganismos probióticos.....	35
<b>Figura 4.</b> Curva de crescimento avaliada por densidade ótica a 660 nm do <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> (A), <i>Lacticaseibacillus casei</i> (B), <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (C) e <i>Lactobacillus helveticus</i> (D) em diferentes meios de cultivo.....	39
<b>Figura 5.</b> Curva de crescimento avaliada contagem total em placas (UFC/mL) do <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> (A), <i>Lacticaseibacillus casei</i> (B), <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (C) e <i>Lactobacillus helveticus</i> (D) em diferentes meios de cultivo.....	40
<b>Figura 6.</b> Efeito da interação entre os tratamentos e o tempo de incubação na contagem de UFC/mL de <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> (A), <i>Lacticaseibacillus casei</i> (B), <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (C) e <i>Lactobacillus helveticus</i> (D).....	42
<b>Figura 7.</b> Capacidade antioxidante nos hidrolisados proteicos obtidos após a digestão pelos métodos de DPPH, FRAP e ORAC.....	45
<b>Figura 8.</b> Capacidade antioxidante na dispersão de 10 % de proteína antes da digestão gastrointestinal pelos métodos de DPPH, FRAP e ORAC.....	46

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Composição centesimal do caseinato de cálcio, isolado proteico do soro, concentrado proteico de ervilha e isolado proteico de soja. ....38
- Quadro 2.** Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito dos tratamentos, tempo de incubação, bem como a interação desses fatores sobre o crescimento dos microrganismos probióticos. ....40
- Quadro 3.** Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito dos tratamentos, tempo de incubação, bem como a interação desses fatores sobre a viabilidade dos microrganismos probióticos. ....41

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1.	Proteínas do leite e proteínas vegetais.....	16
2.2.	Digestibilidade Gastrointestinal.....	21
2.3.	Probióticos e seus efeitos benéficos na saúde gastrointestinal.....	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1.	Matérias-primas e sua caracterização.....	32
3.2.	Simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal.....	32
3.4.	Avaliação do efeito dos hidrolisados proteicos obtidos após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> no crescimento de microrganismos probióticos.....	35
3.5.	Capacidade Antioxidante.....	36
3.6.	Delineamento experimental e análise dos dados.....	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1.	Caracterização das fontes proteicas utilizadas.....	38
4.2.	Crescimento e viabilidade dos probióticos suplementados com diferentes hidrolisados.....	38
4.3.	Capacidade Antioxidante.....	44
5.	CONCLUSÕES.....	47
6.	REFERÊNCIAS.....	48

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, o mundo tem sido palco de mudanças em relação ao crescimento populacional e às escolhas alimentares. O aumento da população e as crescentes preocupações com a sustentabilidade têm impulsionado uma notável preferência pela proteína vegetal em detrimento da proteína animal (WRI, 2019; ONU, 2019; Onwezen et al., 2021). Essa transição alimentar, fundamentada em questões ambientais e nutricionais, tem provocado uma reavaliação das fontes proteicas consumidas pela sociedade, onde a proteína vegetal tem se destacado como uma opção, tanto para atender às necessidades nutricionais da população crescente quanto para reduzir o impacto ambiental da produção de alimentos (Neacsu, McBey, & Johnstone, 2017; Willet et al., 2019; Pyett et al., 2019; Onwezen, et al., 2021).

No entanto, é importante reconhecer que existem diferenças notáveis entre as proteínas vegetais e animais em termos de composição aminoacídica e estrutura, o que pode impactar sua digestibilidade, biodisponibilidade de nutrientes e efeitos sobre a microbiota humana. As proteínas lácteas são consideradas uma fonte rica e completa de todos os nove aminoácidos essenciais, presentes em proporções adequadas, os quais não podem ser sintetizados pelo organismo humano e, portanto, devem ser obtidos por meio da dieta. As proteínas do soro apresentam a maioria dos aminoácidos essenciais em quantidades acima da recomendação, com exceção dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), que não estão em excesso, mas atendem às recomendações para todas as faixas etárias (Sgarbieri, 2017; Deeth et al., 2019). As proteínas vegetais, por outro lado, podem ser deficientes em determinados aminoácidos essenciais, como lisina, metionina e triptofano, sendo que a obtenção de um perfil mais completo de aminoácidos pode exigir a combinação de diferentes fontes proteicas, por exemplo, feijão e arroz, ou lentilhas e quinoa (Omosebi et al., 2018; Bessada et al., 2019).

No que diz respeito à estrutura, as caseínas, que representam 80% das proteínas totais do leite, estão arrançadas em *nanocluster* de fosfato de cálcio na forma de micela, enquanto as proteínas vegetais apresentam estrutura globular, com cadeias polipeptídicas que se dobram para formar estrutura compacta (Farrell et al., 2004; Day, 2013; Walstra et al., 2006). Não só pela diferença de estrutura, como também pela presença de fatores antinutricionais, como por exemplos inibidores de protease, as proteínas vegetais também tendem a ser mais difíceis de digerir do que proteínas de origem animal (Nasrabadi et al., 2021).

O projeto Microbioma Humano (Human Microbiome Project – HMP), criado em 2008 pelo National Institutes of Health (NIH), representou um grande avanço na caracterização da

microbiota intestinal humana e é crescente o número de evidências científicas que relacionam a dieta à microbiota humana. Para além da sua densidade nutricional, proteínas de forma geral, e proteínas lácteas em particular, têm sido consideradas importantes fontes de peptídeos bioativos (Korhonen, 2009). Desta forma, a composição da microbiota pode ser impactada pelo tipo de proteína consumida, e diferentes fontes de proteínas podem modular de forma distinta a diversidade e atividade dos microrganismos presentes no intestino (Gorissen et al., 2018). Estudo realizado por Ding e Li (2021) reportou que os hidrolisados da proteína do soro do leite foram distribuídos no citoplasma de bactérias lácteas, sugerindo que esses hidrolisados podem ser absorvidos por bactérias através de sua membrana celular. Bottari et al., (2017) observaram que diferentes cepas de lactobacilos e bifidobactérias utilizaram peptídeos com 2 a 5 resíduos de aminoácidos derivados de digestão *in vitro* do queijo Parmeggiano Reggiano como fonte de nitrogênio para seu desenvolvimento. Isto sugeri a importância dos hidrolisados de proteínas e dos peptídeos resultantes da digestão como potencial fonte de nutrientes para as bactérias probióticas.

A literatura reporta que várias proteínas de origem animal como proteínas do peixe *Ilisha elongata* (Liu et al., 2022), hidrolisado de ovo (Zhang et al., 2020) e hidrolisado de proteína de resíduo de processamento de aves, podem promover o crescimento de bactérias lácticas e bifidobactérias (Lazzi et al., 2013; Li et al., 2021). Quando voltamos nossa atenção para o uso de hidrolisados proteicos vegetais por microrganismos probióticos, poucos são os trabalhos encontrados na literatura. Contudo, Zhão et al., (2022) e Zhang et al., (2022) demonstraram que os hidrolisados de proteína de feijão e proteína de soja digeridas são promissores para compreensão de como esses microrganismos se desenvolvem utilizando ingredientes proteicos alternativos como substrato.

A disponibilidade de informações e dados sobre a digestibilidade de fontes proteicas vegetais e sua influência sobre a microbiota intestinal humana é limitada na literatura atual e ainda não está completamente compreendida. No entanto, é amplamente reconhecida cientificamente a forte associação entre alimentação, saúde e doença em função da microbiota intestinal humana, uma vez que a dieta desempenha papel fundamental na composição e função da microbiota intestinal, e essa relação influencia significativamente o estado de saúde, metabolismo e sistema imunológico do hospedeiro (Van Vliet, Burd, 2015; Gorissen et al., 2018; Sá, Moreno, & Carciofi, 2020). Essa área de estudo ainda se encontra em ascensão, e poucos são os trabalhos encontrados sobre o tema, sendo relevante entender como ingredientes proteicos vegetais podem impactar os microrganismos probióticos. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial dos digeridos obtidos após digestão

gastrointestinal simulada de ingredientes proteicos em favorecer o crescimento de microrganismos probióticos específicos, bem como sua atividade antioxidante.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Proteínas do leite e proteínas vegetais

Do ponto de vista de estrutura, que se refere a sua conformação natural, as proteínas apresentam estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. Apesar de sua complexidade estrutural, elas podem ser divididas em dois grandes grupos: i) proteínas estruturais, que estão entre os principais constituintes dos tecidos como por exemplo o colágeno e queratina e ii) proteínas com atividade biológica sendo um exemplo deste grupo as enzimas, proteínas de transporte e de reserva, hormônios, estruturas contráteis e proteínas com atividade imunológica (Bessada et al., 2019).

As proteínas desempenham um papel fundamental como macronutrientes e seu consumo garante ao corpo humano os elementos necessários para as vias de biossíntese, especialmente para a síntese de proteínas. As proteínas dietéticas fornecem aminoácidos essenciais e aminoácidos sinalizadores, como a leucina, que desempenham um papel crucial na regulação do metabolismo e no estímulo ao anabolismo (Hoehnel et al., 2022). Além disso, elas estão encarregadas de diversos atributos físico-químicos e sensoriais nos alimentos, podendo ter funções como ingredientes e contribuir para a manutenção da saúde (Shahidi - Zhong, 2008).

O leite contém aproximadamente 3,5% de proteínas, as quais podem ser divididas em dois principais grupos: as caseínas, que são a fração que precipita após a acidificação do leite a pH 4,6, e as proteínas do soro, que permanecem solúveis nessas mesmas condições. As caseínas representam cerca de 80% das proteínas do leite, enquanto as proteínas do soro correspondem a aproximadamente 20% do total de proteínas presentes no leite (Farrell et al., 2004; Walstra et al., 2006). A função natural das proteínas do leite é disponibilizar aos jovens mamíferos os aminoácidos requeridos e necessários para o desenvolvimento e expansão muscular e de outros tecidos, bem como proteínas biologicamente ativas, como, por exemplo, imunoglobulinas, proteínas ligantes de vitaminas e de metais e hormônios proteicos (Walstra et al., 2006). As caseínas apresentam uma estrutura de micela de fosfato de cálcio coloidal sendo formada pela associação de subunidades de caseína, que incluem as frações  $\alpha_1$ -caseína,  $\alpha_2$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína que são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos respectivamente (Walstra et al., 2006; Goff, 2009; Dalgleish, 2011).

Em função de sua composição de aminoácidos a micela de caseína é negativamente carregada e com atividade anfipática, por ter porções hidrofílicas e hidrofóbicas. A estrutura das suas moléculas expõe os resíduos hidrofóbicos, o que resulta em uma forte associação entre as caseínas, tornando-as insolúveis em água. A estabilidade da micela de caseína no leite é proporcionada pela repulsão eletrostática, repulsão estérica (causada pela presença da  $\kappa$ -caseína na superfície da micela formando os “cabelos da caseína”) e formação de uma camada de hidratação (Dagleish et al., 2012; Day et al., 2017; Goulding, 2020). As proteínas do soro são globulares e principalmente constituídas por regiões hidrofóbicas. Quando essas regiões se dobram, elas adquirem uma conformação que promove sua solubilidade. As proteínas do soro do leite bovino são constituídas principalmente por  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, sendo esta última a mais amplamente disponível, representando cerca de 80% das proteínas do soro. Além disso, estão presentes imunoglobulinas, lisozima e lactoferrina, bem como algumas outras proteínas com funções particulares, presentes em menor quantidade (Goulding; Fox; Mahony, 2020).

Caseínas e proteínas do soro apresentam um valor nutritivo significativo. As caseínas são proteínas de alta qualidade nutricional, pois contêm todos os aminoácidos essenciais necessários para o crescimento e desenvolvimento dos tecidos do corpo. Elas são particularmente ricas em aminoácidos como leucina, isoleucina, valina, lisina e fenilalanina (Smyth et al., 2004; Silva et al., 2019). As proteínas do soro apresentam a maioria dos aminoácidos essenciais, com exceção dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), que não estão presentes em excesso, mas estão disponíveis em quantidades suficientes para atender às recomendações nutricionais de todas as faixas etárias. Dentre outras ações e benefícios citados na literatura para peptídeos liberados da estrutura das proteínas lácteas podemos mencionar a disponibilização de energia para o organismo, reparação celular, atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anti-hipertensiva (Sgarbieri, 2017; Goulding; Fox; Mahony, 2020).

As proteínas de origem vegetal, como as de leguminosas (feijão, ervilha, lentilha, soja), oleaginosas (amêndoas, castanhas, sementes de girassol) e cereais (trigo, arroz, milho) apresentam em sua maioria estrutura globular, que se assemelha mais a uma esfera ou a um elipsoide (Day, 2013). As proteínas vegetais são classificadas em quatro grupos com base em sua solubilidade em diferentes meios de dissolução, conhecidos como as frações de Osborne. Após extrações sequenciais utilizando água, solução salina diluída, etanol 70% e solução alcalina, foram obtidas quatro frações proteicas distintas: albumina, que é solúvel em água; globulina, que é solúvel em soluções salinas; prolaminas, solúveis em etanol; e glutelinas,

solúveis em soluções alcalinas. Nas leguminosas, as frações proteicas presentes que representam a maior quantidade são principalmente albuminas e globulinas (Daniels et al., 1997; Neves et al., 2006).

As proteínas estão distribuídas em diferentes localidades na estrutura do vegetal, como por exemplo nas sementes, folhas, frutos, raízes, rizomas, tubérculos, entre outras partes (Bildanova et al., 2013). A disponibilidade e o perfil de aminoácidos variam dependendo da fonte proteica vegetal. Muitos estudos relatam que as proteínas vegetais têm uma qualidade proteica inferior às proteínas animais, tal fato está associado à ausência de aminoácidos indispensáveis no perfil proteico desses vegetais (Chardigny & Walrand, 2016; Herreman et al., 2020; Mariotti, 2017; Weindl et al., 2020).

Enquanto as proteínas provenientes de animais fornecem os aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina) sendo frequentemente consideradas "completas", as proteínas vegetais, como as encontradas em leguminosas, sementes e outros vegetais, podem ter deficiência ou quantidades baixas de aminoácidos sulfurados essenciais específicos, especialmente triptofano e treonina. No entanto, quando consumidas juntamente com alimentos que possuem níveis elevados de aminoácidos sulfurados (como cereais) e triptofano, as leguminosas fornecem uma combinação equilibrada de aminoácidos essenciais. Além de conterem aminoácidos essenciais, a qualidade nutricional das proteínas também depende de sua digestibilidade e da capacidade de atender às necessidades específicas do organismo em relação aos aminoácidos. Por esse motivo, as proteínas vegetais, embora sejam importantes para a nutrição, são geralmente consideradas de qualidade inferior às proteínas animais, pois podem apresentar deficiência em um ou mais aminoácidos essenciais e menor digestibilidade. Contudo, ao combinar diferentes fontes vegetais e aplicar técnicas que aumentam a digestibilidade, como cozimento ou fermentação, é possível suprir as necessidades nutricionais de forma eficaz (Boye, Zare & Pletch, 2010; Gilbert et al., 2011; Omosibi et al., 2018; Bessada et al., 2019).

Além disso, as proteínas vegetais podem conter em sua composição aos chamados fatores antinutricionais, que são compostos produzidos pelas plantas como uma forma de proteção biológica. Esses fatores antinutricionais são caracterizados por reduzir a digestibilidade das proteínas e por apresentar atributos sensoriais indesejáveis. No entanto, estudos têm sido realizados para modificar as proteínas vegetais e têm obtido sucesso na formação de ingredientes multifuncionais. Essas modificações, que podem ser por métodos químicos, físicos ou biológicos, têm como objetivo modular e/ou alterar as propriedades físico-químicas das proteínas vegetais, eliminando assim as limitações causadas pelos fatores

antinutricionais. Esses ensaios têm se mostrado promissores ao permitir a criação de ingredientes vegetais com propriedades tecnológicas aprimoradas e sem os efeitos negativos dos fatores antinutricionais. Isso é importante para a indústria alimentícia, pois possibilita o desenvolvimento de alimentos mais nutritivos, saborosos e com melhor aceitação pelos consumidores (Nasrabadi et al., 2021; Mudgil et al., 2020).

Dentre os ingredientes proteicos vegetais, podemos citar as proteínas presentes nas leguminosas, soja (*Glycine max (L.) Merrill*) e ervilha (*Pisum sativum L.*), que são fontes ricas em proteínas, além de carboidratos, fibras alimentares, vitaminas do complexo B e minerais. No que diz respeito ao perfil de aminoácidos, as leguminosas possuem abundância de lisina, um aminoácido que é limitado nos cereais, porém apresentam mais baixas de metionina, cisteína e triptofano (Bessada et al., 2019; Sá et al., 2020).

A soja é considerada uma planta de cultura anual pertencente à família das leguminosas, cuja origem é associada ao continente asiático, especialmente à região do rio Yangtzé, na China. A variedade cultivada atualmente é o resultado de um longo processo de aprimoramento genético realizado ao longo do tempo, partindo de genótipos ancestrais distintos dos que são utilizados nos dias de hoje (Barbosa et al., 2019). O Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo, com destaque para estados da região Centro-Oeste, Sul e mais recentemente a região Norte. O Mato Grosso lidera a produção nacional, representando cerca de 26% da safra total, seguido pelo Paraná e Rio Grande do Sul, que contribuem com aproximadamente 15% e 14%, respectivamente (Dos Reis et al., 2024). Outros estados como Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Bahia também se destacam, consolidando o país como um dos principais exportadores globais. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção brasileira na safra 2023/2024 foi estimada em 154 milhões de toneladas, reforçando a importância estratégica da soja para a economia nacional (CONAB, 2024).

O isolado de proteína de soja (IPS) é uma das principais proteínas vegetais, com um teor proteico superior a 90% e contendo todos os aminoácidos essenciais, sendo considerada uma fonte de proteína de alta qualidade. Além disso, é rico em isoflavonas, compostos fitoestrogênicos que conferem diversos benefícios à saúde humana, incluindo a prevenção de câncer, promoção da saúde cardiovascular, controle da osteoporose e redução dos sintomas da menopausa (Barbosa et al., 2006; Li et al., 2025).

A ervilha é uma planta anual encontrada em regiões de clima temperado sendo produzidas localmente na Noruega, Canadá, Rússia e Estados Unidos podendo servir como uma alternativa sustentável à soja, garantindo a redução das pegadas ambientais negativas

associadas à produção de alimentos. Isso se deve à sua menor demanda hídrica, maior versatilidade em solos e climas e menor uso de agroquímicos em sua produção (Ferawati et al., 2021). A produção no Brasil está concentrada em estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Goiás e Distrito Federal, sendo a área destinada à produção muito pequena com pouca representatividade no mercado e insuficiente para suprir a demanda nacional. Em 2019, o país importou 30,5 mil toneladas de ervilha, originárias principalmente da Argentina, Canadá, Estados Unidos e Nova Zelândia (CONAB, 2020; Lambrecht et al., 2023). As ervilhas possuem uma quantidade significativa de proteína, que varia de 18% a 35% em base seca. Além disso, elas contêm entre 35% e 55% de amido e 4% a 7% de fibra (Oliveira et al., 2011). A quantidade de lisina presente na ervilha faz com que seja um bom complemento na alimentação no ponto de vista nutricional uma vez que lisina está relacionada a um melhor desempenho na síntese de proteínas, no crescimento, na reposição de tecidos (Filgueira, 2000). Vale ressaltar que as proteínas da ervilha possuem os aminoácidos essenciais isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e arginina em uma proporção adequada, sendo a falta de metionina o aminoácido limitante (Boye et al., 2010; Tulbek et al., 2017).

O desenvolvimento de novos produtos análogos à carne acelerou significativamente nos últimos anos, destacando-se as alternativas mais promissoras baseadas em proteínas de fontes vegetais, como soja e ervilha. Paralelamente, o mercado de substitutos de laticínios também apresentou uma expansão notável. Esses substitutos, modificados a partir de proteínas vegetais, são elevados com a alegação de qualidade equivalente a custos mais baixos, enquanto atendem às prioridades globais, como a redução das emissões de gases de efeito estufa e as limitações do desmatamento (Nychas et al., 2021; Kumar et al., 2022).

Os principais produtos derivados da proteína de soja incluem a farinha de soja, o concentrado de proteína de soja, o isolado de proteína de soja, além das proteínas de soja texturizadas e hidrolisadas. A proteína de soja texturizada desempenha um papel crucial ao substituir parcial ou totalmente as proteínas de origem animal em diversos produtos alimentícios, sendo amplamente utilizada como fonte proteica em alternativas vegetarianas à carne. A farinha, o concentrado e o isolado de proteína de soja e seus produtos texturizados são, em sua maioria, utilizados como ingredientes em alimentos processados, devido às suas propriedades funcionais, como a capacidade de retenção de água e gordura, emulsificação, formação de espuma e gelificação. Além disso, a proteína de soja é uma importante fonte de proteína em fórmulas infantis. A bebida a base de soja, por sua vez, é utilizado como

substituto do leite de vaca, especialmente por veganos e indivíduos com alergia à proteína do leite (Chyang et al., 2021; Cornet et al., 2021).

A ervilha tem se destacado como uma importante fonte de proteína comercial, amplamente explorada devido à sua capacidade de crescimento em diversas regiões ao redor do mundo e à facilidade de remoção da casca. Comercialmente, a proteína de ervilha é oferecida em três formas principais: farinha, concentrada e isolada. As proteínas de ervilha encontram uma ampla gama de aplicações em produtos alimentícios, incluindo produtos de panificação, barras de lanche nutritivas, massas, bebidas, fórmulas infantis, além de substitutos de carne e frutos do mar (D’Alessio et al., 2024). O uso crescente da proteína de ervilha deve-se, em parte, às suas excelentes propriedades funcionais, como a capacidade de ligação em água, emulsificação, gelificação, além de sua textura e valores nutricionais (Sandberg, 2011; Lam et al., 2018). Em produtos cárneos, sua aplicação tem sido principalmente em hambúrgueres e salsichas. O concentrado de proteína de ervilha também é utilizado na produção de substitutos do leite em pó para a indústria de panificação e sobremesas e em patês (Sandberg, 2011). Apesar das vantagens apontadas por diversos autores em relação a exploração de vegetais e leguminosas como fontes proteicas, ainda se exige um grande esforço, na seleção das fontes mais adequadas, ou na implementação de tecnologias de produção e processamento otimizadas para melhorar as suas propriedades reológicas e sensoriais. No entanto, em termos de aceitabilidade pelos consumidores, poderá ser necessário reduzir ou até mesmo eliminar sabores indesejáveis, como por exemplo, o conhecido sabor de “feijão” que é geralmente associado às leguminosas (Bessada et al., 2019).

## **2.2. Digestibilidade Gastrointestinal**

A digestão gastrointestinal e seu impacto na microbiota intestinal, na saúde e nas doenças é atualmente um tema de interesse dos cientistas e processadores de alimentos, bem como dos consumidores em geral, que estão cada vez mais atentos e preocupados com sua alimentação. É um processo que envolve tanto aspectos físicos quanto químicos, nos quais os alimentos são degradados e decompostos por meio de ações mecânicas e de diversas enzimas, liberando nutrientes que são absorvidos e utilizados pelo nosso organismo. Os processos de desintegração dos alimentos ocorrem majoritariamente na boca e no estômago, enquanto os processos enzimáticos e absorção ocorrem majoritariamente na fase intestinal da digestão (Guerra et al., 2012). Compostos não absorvidos no intestino delgado são transportados para o intestino grosso, onde componentes não digeridos são fermentados pela microbiota colônica

(Boland, 2016; Chernoff, 2015). No caso das proteínas, elas são hidrolisadas a uma ampla variedade de peptídeos e aminoácidos, sendo essencial compreender como as proteínas presentes nos alimentos são digeridas, pois isso afeta seu valor nutricional e, adicionalmente, os produtos resultantes da degradação das proteínas podem ter relevância fisiológica (Santos-Hernández et al., 2020). Desta forma, protocolos harmonizados de digestão *in vitro* como o INFOGEST, que é uma rede de cooperação internacional com objetivo de consolidar condições de digestão *in vitro* de alimentos através de um modelo consensual, são úteis para prever a digestibilidade e avaliar as mudanças estruturais das proteínas em condições simuladas que se assemelham às condições fisiológicas (Bohn et al., 2018). O primeiro protocolo INFOGEST foi publicado em 2014 (Minekus et al., 2014) e cinco anos depois, foi publicada uma atualização desse protocolo, o INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019). Mais recentemente, o mesmo grupo publicou uma adaptação do protocolo para avaliação de digestão de idosos (Menard et al., 2023).

O primeiro protocolo INFOGEST (Minekus et al., 2014) buscava padronizar as condições de digestão para simular o processo digestivo humano saudável. Ele fornece diretrizes detalhadas para as etapas oral, gástrica e intestinal, incluindo volumes de enzimas, tempos de incubação e pH. Contudo, com o avanço da pesquisa, houve a necessidade de aprimorar a representação de aspectos específicos da digestão. Então, o segundo protocolo, o INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019) introduziu várias modificações importantes. Dentre as modificações temos uma melhor especificação de enzimas: ajustes na concentração e atividade das enzimas pancreáticas e pepsina para maior realismo fisiológico. Maior flexibilidade no pH: recomendou um controle mais refinado do pH em cada fase, especialmente na fase intestinal. Inclusão de inibidores de proteases. Revisão dos parâmetros físico-químicos: ajustes nos parâmetros de bile, para refletir melhor a sua concentração em condições fisiológicas. Essas modificações foram fundamentais para melhorar a reprodutibilidade dos resultados e permitir aplicações mais diversas, como estudos com diferentes matrizes alimentares.

O protocolo INFOGEST 2.0 é composto por três fases sequenciais que simulam o processo de digestão: fase oral, fase gástrica e fase intestinal. Cada uma dessas fases utiliza fluidos específicos, cuidadosamente formulados para reproduzir a composição química e enzimática de cada etapa do sistema digestivo.

Na fase oral utiliza-se o fluido salivar simulado (SSF), composto por KCl (15,1 mmol/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,7 mmol/L), NaHCO<sub>3</sub> (13,6 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (0,15 mmol/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,06 mmol/L) e CaCl<sub>2</sub> (0,3 mmol/L). Esse fluido é ajustado para um pH neutro

(cerca de 7,0) e o tempo de incubação é curto, geralmente de 2 minutos, representando a ação da saliva na digestão inicial.

Na fase gástrica utiliza-se o fluido gástrico simulado (SGF), composto por KCl (6,9 mmol/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,9 mmol/L),  $\text{NaHCO}_3$  (25 mmol/L), NaCl (47,2 mmol/L),  $\text{MgCl}_2$  (0,1 mmol/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (0,5 mmol/L) e  $\text{CaCl}_2$  (0,3 mmol/L). O fluido gástrico simula as condições do estômago durante a digestão, incluindo a presença de ácido clorídrico (HCl), o que mantém o pH ácido (cerca de 3,0). O tempo de incubação dessa fase é de aproximadamente 2 horas.

Na fase intestinal utiliza-se o fluido intestinal simulado (SIF), composto por KCl (6,8 mmol/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,8 mmol/L),  $\text{NaHCO}_3$  (85 mmol/L), NaCl (38,4 mmol/L),  $\text{MgCl}_2$  (0,33 mmol/L) e  $\text{CaCl}_2$  (0,3 mmol/L). O fluido é ajustado para um pH neutro (cerca de 7,0), refletindo as condições do intestino. O tempo de incubação dessa fase é de aproximadamente 2 horas.

A adaptação do protocolo para a avaliação de digestão de idosos tornam o protocolo mais representativo nas condições fisiológicas dessa população, permitindo a avaliação mais precisa dos processos digestivos e da biodisponibilidade de nutrientes em indivíduos idosos, representando um passo à frente ao abordar as particularidades da digestão em idosos (Menard et al., 2023).

Uma das principais diferenças está na composição dos fluidos digestivos. Na fase oral, o protocolo para idosos considera a redução do fluxo salivar, refletindo a menor produção de enzimas, como a amilase salivar. Já na fase gástrica, o fluido gástrico simulado (SGF) para idosos apresenta menor concentração de ácido clorídrico (HCl), resultando em um pH menos ácido (em torno de 3,7), comparado ao pH de 3,0 utilizado no protocolo de adultos.

O fluido intestinal simulado (SIF) no protocolo para idosos é ajustado para considerar a menor coordenação de bicarbonato, enzimas pancreáticas e sais biliares, características comuns em indivíduos mais velhos. Além disso, o tempo de incubação é um fator que se altera no protocolo para idosos, especialmente na fase gástrica que leva em torno de 3, enquanto o protocolo para adultos utiliza tempo padrão de 2 horas. Outra diferença relevante é a concentração das enzimas digestivas. A concentração de enzimas utilizadas no protocolo para adultos sofre uma redução no protocolo para idosos, para simular a menor atividade enzimática frequentemente observada com o envelhecimento.

A disponibilidade de dados sobre a digestibilidade de proteínas individuais ainda é limitada, e a avaliação teórica da sua disponibilidade enfrenta diversos desafios metodológicos. A Food and Agriculture Organization propôs que essa lacuna de dados

poderia representar uma oportunidade significativa para aprimorar a avaliação da qualidade das proteínas (FAO, 2013). No entanto, até que esses dados estejam disponíveis, o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA), comumente conhecido e chamado de digestibilidade fecal da proteína é amplamente utilizada como um indicador indireto da biodisponibilidade dos aminoácidos individuais (Mariotti, 2017). Atualmente, ainda existe uma escassez de dados na literatura que possam aprimorar e aprofundar nossa compreensão das diferenças entre as proteínas de origem vegetal e animal no processo digestivo (Rutherford et al., 2015).

Segundo Moughan e Stevens (2012) para que as proteínas sejam eficientemente utilizadas como fontes de aminoácidos pelo organismo, é necessário que elas sejam digeridas no intestino, sendo liberadas como aminoácidos livres. Uma fonte de proteína que possui essa capacidade é classificada como uma fonte de proteína de fácil digestão. No entanto, há evidências na literatura que indicam que há diferenças na digestibilidade entre as diferentes fontes de proteína e suas origens (Mathai et al., 2017; Bailey-Stein, 2020). Em geral, a maioria das fontes de proteína animal, incluindo o leite, é caracterizada por alta digestibilidade (Bailey-Stein, 2020; Hodgkinson et al., 2018; Mathai et al., 2017), enquanto algumas fontes de proteína vegetal têm digestibilidade muito menor (Chalupa-Krebzdak et al., 2018; Wolfe, et al., 2018; Huppertz et al., 2021).

As proteínas do leite bovino têm uma das maiores digestibilidades dentre as proteínas alimentares, atingindo aproximadamente 95%. Os valores de digestibilidade das caseínas e proteínas do soro variam de 94% a 97%, respectivamente. Ao longo da digestão, a caseína passa por mudanças em sua conformação devido à ação das enzimas digestivas a qual são expostas. Entretanto, sua hidrólise resulta em uma liberação lenta de aminoácidos no plasma após a alimentação, levando cerca de sete horas para ser completamente absorvida. Por esse motivo, ela é frequentemente chamada de proteína de absorção lenta (Almeida et al.; 2013; Dupont et al., 2020). Por outro lado, as proteínas do soro são digeridas mais rapidamente do que as caseínas, resultando em uma liberação mais rápida de aminoácidos na corrente sanguínea (“*fast protein*”). Devido à sua rápida digestão e perfil de aminoácidos, as proteínas do soro do leite são frequentemente consumidas após o exercício para fornecer aminoácidos rapidamente para a recuperação muscular (Tipton et al., 2007; Costa et al., 2021).

Segundo Berrazaga et al. (2019), proteínas de origem vegetais geralmente apresentam menor qualidade proteica ou um padrão proteico inferior quando comparado às proteínas animais. Isso pode ser atribuído, em parte, à menor digestibilidade das proteínas vegetais, que muitas vezes é inferior à das proteínas animais. Compostos antinutricionais, como fitatos e inibidores de tripsina, que ocorrem naturalmente em muitas plantas, reduzem

substancialmente a digestibilidade da proteína quando presente no alimento ingerido. No entanto, tanto o conteúdo dos compostos antinutricionais quanto a digestibilidade da proteína dependem da matriz alimentar, da estrutura do alimento e das técnicas de processamento aplicadas (Mariotti et al., 2017; Hoehnel et al., 2022).

Em um estudo que comparou a digestibilidade das proteínas de soja e das proteínas do leite, a digestibilidade média foi de 94% para a soja, com aminoácidos individuais na faixa de 89% - 97%, enquanto para o leite o valor médio foi de 96%, e os valores variaram de 92% a 99% em relação à digestibilidade de aminoácidos individuais (Gaudichon et al., 2002). Recentemente, foi observado que isolados de ervilha e lentilha submetidos à digestão apresentaram níveis de nitrogênio solúvel comparáveis às das proteínas do leite, de acordo com o protocolo INFOGEST (Santos-Hernández et al., 2020). A lentilha e o grão-de-bico são amplamente incluídos nas dietas mediterrâneas e apresentam uma combinação balanceada de aminoácidos essenciais, além de demonstrarem uma digestibilidade adequada da proteína em estudos *in vitro* (Sánchez-Vioque et al., 1999).

Foram identificados diversos elementos que podem influenciar a digestibilidade das proteínas, tais como a presença de compostos biologicamente ativos, o processamento térmico e a própria estrutura química da proteína. Esses fatores influenciam a facilidade de hidrólise da proteína, podendo resultar em maior ou menor disponibilidade de aminoácidos para absorção pelo organismo (Hernández et al., 1984; Liu, 1995).

Durante o processo de digestão gastrointestinal as proteínas sofrem um processo de hidrólise, onde frações específicas de proteínas, com sequência de aminoácidos são liberados e acabam promovendo um efeito benéfico em diversas funções biológicas, podendo desempenhar papéis como antioxidantes, antidiabéticos, anti-hipertensivos e antimicrobianos, sendo chamados de peptídeos bioativos (Castro & Sato, 2015; Nongonierma & Fitzgerald, 2017). Diversos estudos demonstram que os hidrolisados de proteínas de diferentes origens, e principalmente do leite, podem atuar como fatores de crescimento para microrganismos benéficos no intestino conhecidos como probióticos (Poch & Bezkorovainy, 1991; Ibrahim & Bezkorovainy, 1994; Liepke et al., 2002; Oda et al., 2013; Meli et al., 2013, 2014; Bottari et al., 2017).

### **2.3. Probióticos e seus efeitos benéficos na saúde gastrointestinal**

Em condições normais, o intestino é colonizado por diferentes espécies de bactérias, principalmente anaeróbicas, destacando-se os gêneros bacteroides, *Bifidobacterium*,

*Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* e *Fusobacterium* (Lee et al., 1999; Paixão & Castro, 2016). A microbiota intestinal desempenha um papel crucial no desenvolvimento de diversas reações bioquímicas essenciais que ocorrem em seu ambiente natural. Além disso, uma microbiota equilibrada atua como uma barreira protetora, dificultando a colonização do intestino por microrganismos potencialmente patogênicos. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio na microbiota (disbiose), a proporção de microrganismos ambientais patogênicos aumenta, favorecendo o surgimento de infecções bacterianas (Ziemer & Gibson, 1998).

O intestino humano é um ecossistema complexo, onde ocorre uma extensa interação entre nutrientes, microbiota e células hospedeiras (Butel, 2014; Azad et al., 2018). Durante muito tempo, as relações entre esses microrganismos e as células hospedeiras foram consideradas predominantemente patogênicas, devido à invasão de toxinas na mucosa intestinal, sua translocação, disseminação e consequente causa de transmissão sistêmica. Atualmente, vários estudos relataram interações benéficas entre a microbiota comensal e o corpo humano e indicaram que a microbiota atua como um parceiro real. Dentre os benefícios listados na literatura, bactérias probióticas estão associadas à diminuição da sensibilidade ou intolerância à lactose, inibição de microrganismos prejudiciais, prevenção de episódios de diarreia, diminuição dos índices de colesterol, fortalecimento da resposta imune e proteção contra o desenvolvimento de câncer no cólon (Saarela et al., 2002; Sanders, 2003; Azar et al., 2018).

Desta forma, é possível afirmar que os microrganismos probióticos exercem uma influência positiva sobre a microbiota intestinal humana por meio de mecanismos como a competição com microrganismos indesejáveis no nosso intestino e ações imunológicas (Puupponen-Pimiä et al., 2002). Estudos mostram que vários probióticos podem modular diferentes aspectos da fisiologia digestiva, incluindo a imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal (Fioramonti, Theodorou, Bueno, 2003). Além disso, a interação das bactérias probióticas com os receptores localizados na superfície dos enterócitos desencadeia reações em cascata que estimulam a produção de citocinas (Kaur, Chopra, Saini, 2002).

O termo "probiótico" tem origem grega e significa "para a vida". Em 1954, Ferdinand Vergin utilizou o termo "probiótico" em seu artigo intitulado "Anti-und Probiotika", no qual estudou diversos microrganismos para identificar bactérias úteis e determinar os efeitos prejudiciais de agentes antibacterianos e antibióticos na microbiota intestinal (VERGIN, 1994). Mais tarde, em 1965, Lilly e Stillwell introduziram o termo "probiótico" para descrever microrganismos benéficos que estimulam o crescimento de outros microrganismos.

Ao longo do tempo e com a realização de ensaios clínicos em diferentes modelos humanos e animais, a definição de probiótico passou por alterações. Atualmente a definição aceita tanto nacionalmente regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução RDC nº 241/2018) como internacionalmente, é a de microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades corretas, fornece benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001; Sanders, 2003).

Azar et al., (2018) afirmam que apesar do uso de espécies probióticas há bastante tempo para promover a saúde humana, o campo da pesquisa sobre probióticos continua a evoluir, novas descobertas estão sendo feitas e novas cepas de probióticos estão sendo encontradas por meio de pesquisas contínuas. Atualmente, a maioria dos produtos probióticos é formulada com bactérias pertencentes ao gênero de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e outras bactérias ácido lácticas, como *Lactococcus* e *Streptococcus*. Diferentes espécies de microrganismos probióticos vem ganhando espaço em pesquisas e desenvolvimento de produtos com apelo funcional devido a resultados promissores. Estes incluem *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus casei*, e *Lacticaseibacillus rhamnosus*, na qual as propriedades probióticas têm sido amplamente investigadas na prevenção de doenças tanto em seres humanos quanto em animais. Essas espécies probióticas têm a capacidade de modificar a população de microrganismos na microbiota intestinal e regular o funcionamento do ecossistema presente nesse ambiente (He & Shi, 2017).

A microbiota intestinal tem a capacidade de fermentar alguns carboidratos não digeríveis, que, quando apresentam efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, são classificados como prebióticos. Os prebióticos são atualmente considerados ingredientes fermentáveis seletivos, capazes de promover mudanças específicas na composição e atividade da microbiota intestinal, com o objetivo de fornecer benefícios ao organismo hospedeiro (Roberfroid, 2007; Wang, 2009). Na indústria de alimentos em todo o mundo, os prebióticos mais comumente utilizados na fabricação de produtos são os FOS (fruto-oligossacarídeos), inulina, IMO (isomalto-oligossacarídeos), GOS (glico-oligossacarídeos) e os TOS (transgalacto-oligossacarídeos). Entre essas opções, a inulina e os FOS são os mais amplamente utilizados (Sirò et al., 2008; Saad et al., 2011).

Pesquisas evidenciam que hidrolisados de proteínas de várias fontes, especialmente as do leite, têm a capacidade de atuar como fatores de crescimento de microrganismos benéficos como lactobacilos e bifidobactérias (Poch-Bezkorovainy, 1991; Ibrahim-Bezkorovainy, 1994; Liepke et al., 2002; Oda et al., 2013; MELI et al., 2013, 2014;). Botari et al. (2017) observaram que a maioria das bifidobactérias e lactobacilos cresceram mais abundantemente

em digeridos de queijo maturado do que na peptona de controle e exibiu preferências de peptídeos específicos entre cepas e as espécies. Para as bifidobactérias, as preferências de peptídeos foram muito diversas, mas um núcleo de 10 peptídeos com 4 ou 5 resíduos foi consumido por todas as cepas, enquanto os lactobacilos se comportaram de forma mais homogênea e consumiram quase apenas os mesmos 6 peptídeos, principalmente dipeptídeos. Este estudo demonstrou que os peptídeos derivados da digestão gastrointestinal simulada de queijo maturado sustentaram o crescimento da maioria dos lactobacilos e bifidobactérias.

Estudo realizado por Codezo & Norato (2016) demonstrou que os produtos derivados da caseína e as proteínas/peptídeos liberados após a digestão *in vitro*, modulam a composição da microbiota de camundongos, melhorando a abundância de *Bifidobactérias*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* em camundongos obesos fazendo com que as fezes se assemelhem a de camundongos magros. Ding & Li (2021) avaliaram o hidrolisado de proteína de soro de leite no crescimento de *L. acidophilus JCI* e observaram um efeito promotor no crescimento do microrganismo, tendo uma fase lag encurtada fazendo com que o microrganismo atingisse mais rapidamente a fase crescimento microbiano (log).

Ao voltarmos nosso olhar para as bases de dados em busca de estudos que utilizam hidrolisados de proteínas vegetais no crescimento de probióticos, torna-se evidente a existência de uma lacuna científica ainda pouco explorada. Esse cenário ganha relevância diante do crescente protagonismo de ingredientes proteicos vegetais, que têm conquistado cada vez mais espaço nas prateleiras do mercado. Um estudo realizado por Altaf et al., (2006), onde o meio cultura foi adicionado de farinha de lentilha e avaliada como uma fonte alternativa e econômica de nitrogênio para substituir peptona e extrato de levedura no meio de fermentação obteve resultados satisfatórios. Segundo o autor, sua rica composição em proteínas e nutrientes essenciais mostrou ser eficiente no suporte ao crescimento de *Lactobacillus amilophilus GV6* e na produção de ácido L-láctico.

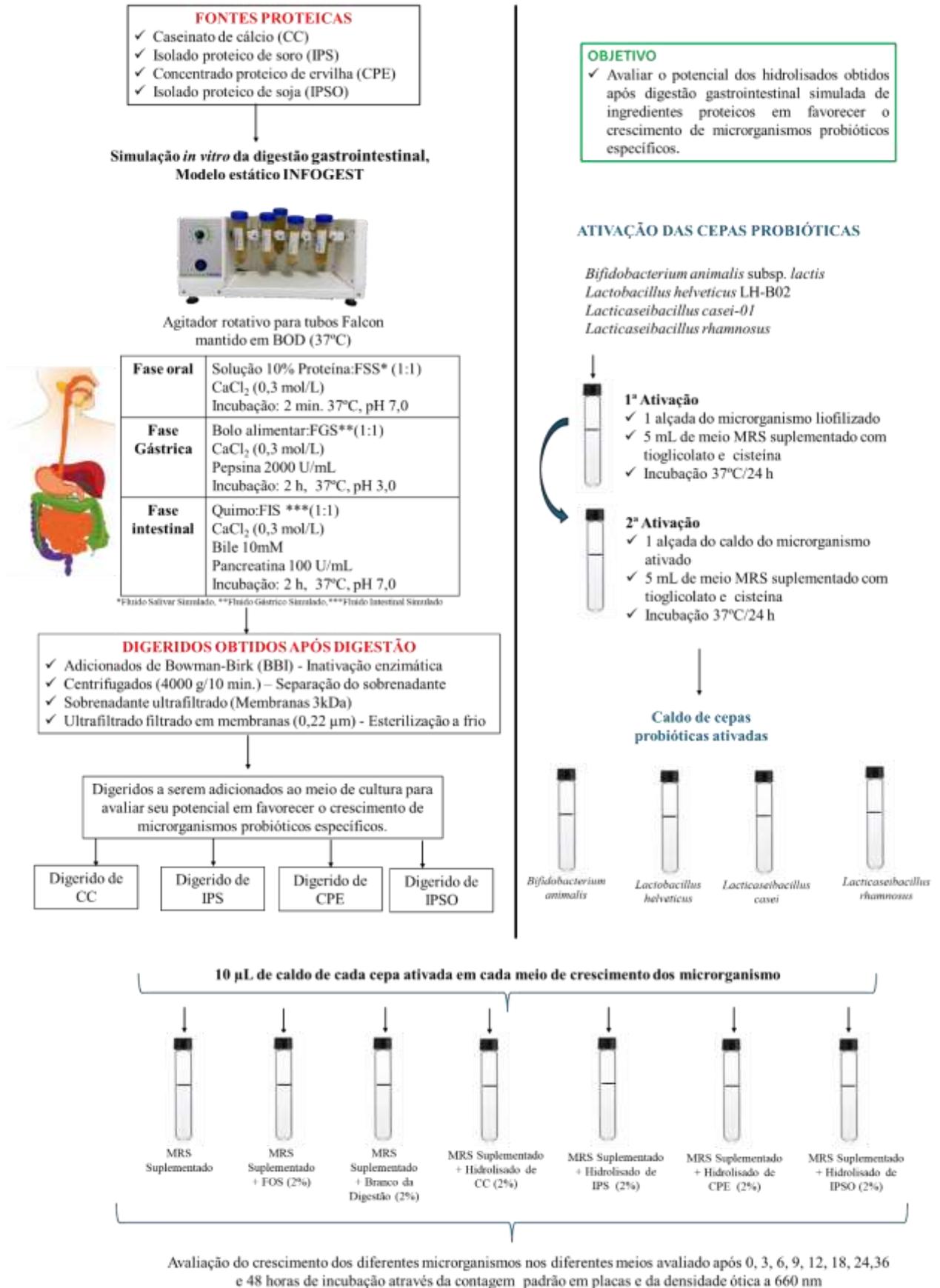
Outro estudo desenvolvido por Thakur et al., (2019), explorou a influência o licor obtido pela maceração de milhos provenientes de resíduos agroindustriais no crescimento de microrganismos probióticos. Os resultados obtidos mostram que esses resíduos, ricos em carboidratos e proteínas, fornecem nutrientes essenciais para o metabolismo do *Lactobacillus casei*, promovendo sua maior atividade fermentativa e a produção de ácido láctico.

Estudos e informações que buscam compreender o impacto da digestão de proteínas vegetais no crescimento e na atividade de microrganismos probióticos ainda são limitados na literatura atual. Essa lacuna ressalta a importância de aprofundar pesquisas sobre a interação

entre os produtos gerados na digestão dessas proteínas e o desenvolvimento da microbiota benéfica, considerando seu papel essencial na saúde intestinal e sistêmica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O objetivo e o esquema geral do trabalho são apresentados na Figura 1. Resumidamente, diferentes fontes proteicas (caseinato de cálcio, isolado proteico de soro, concentrado proteico de ervilha e isolado proteico de soja) foram submetidos à digestão gastrointestinal *in vitro* utilizando sistema estático. Os digeridos obtidos ao final da digestão foram adicionados ao meio de cultura para avaliar seu potencial em favorecer o crescimento de microrganismos probióticos específicos (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*-BLC1, *Lactobacillus helveticus* LH-B02, *Lacticaseibacillus casei*-01 e *Lacticaseibacillus rhamnosus*). O crescimento dos diferentes microrganismos nos meios de crescimento adicionados dos digeridos obtidos ao final da digestão simulada foi avaliado após 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 e 48 horas de incubação através da contagem padrão em placas e da densidade ótica a 660 nm. O experimento completo foi realizado em triplicata



**Figura 1.** Esquema geral do trabalho

### 3.1. Matérias-primas e sua caracterização

As fontes proteicas utilizadas foram o caseinato de cálcio (Alibra Ingredientes Ltda, Marechal Candido Rodon, PR), isolado proteico de soro de leite (Sooro Renner, Techno Park, Campinas - SP), isolado proteico de soja (Profam 646, Archer Daniels Midland Company, Av. Roque Petroni Jr.– São Paulo - SP) e concentrado proteico de ervilha, (Vitessence™ Pulse CT 3602, Ingredion, Mogi Guaçu, SP).

As matérias-primas foram caracterizadas quanto ao conteúdo de sólidos totais, gordura, proteína, cinzas e carboidratos. O conteúdo de sólidos totais foi determinado através da secagem em estufa a 105°C até peso constante (AOAC, 2006; método 990.19). O teor de gordura do caseinato de cálcio e do isolado proteico de soro foi determinado gravimetricamente por Mojonnier (AOAC, 2006; método 989.05) após extração com éter de petróleo e éter etílico. O teor de gordura das fontes de origem vegetal determinado gravimetricamente pelo método de Bligh-Dyer com extração a frio utilizando clorofórmio, metanol e água (Bligh-Dyer, 1959). O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de semi-micro Kjeldahl. Após digestão da amostra em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), foi realizada a destilação em presença de hidróxido de sódio (NaOH) e titulação com solução de ácido clorídrico (AOAC, 2006; método 991.20). O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o NT pelo fator de conversão que varia de acordo com a fonte proteica: 6,38 para o caseinato de cálcio e isolado proteico de soro, 5,5 para soja e 5,36 para ervilha (Labba et al., 2021; Da Silva et al., 2021). O teor de cinzas foi determinado por incineração em forno mufla a 550°C (AOAC, 2006; método 945.46). O teor de carboidrato foi calculado por diferença entre o teor de sólidos totais e os demais constituintes sólidos das respectivas matérias-primas.

### 3.2. Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

A simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal foi realizada utilizando o modelo estático de acordo com protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019) com modificações. Esse protocolo consiste em três fases sequenciais: fase oral, fase gástrica e fase intestinal. As atividades enzimáticas e soluções eletrolíticas foram devidamente medidas e preparadas antes do início do experimento (Brodkorb et al., 2019). Os experimentos de digestão simulada foram realizados em triplicata.

### 3.2.1. Fase oral

As dispersões de proteína (10%) foram preparadas em 10 mL de água Milli-Q e agitadas em vórtex por 3 minutos. Em seguida, após avaliação do pH, foram submetidas à digestão gastrointestinal *in vitro* conforme protocolo INFOGEST, com modificações.

Um volume 5 mL das dispersões proteicas foram misturados a 4 mL de fluido salivar simulado (KCl 15,1 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,7 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 13,6 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0,15 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,06 mmol/L), 25 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,3 mol/L e 975 µL de água ultrapura, homogeneizados manualmente e incubados em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) sob agitação com auxílio de um agitador rotativo para tubos Falcon (Figura 2) a 37°C, pH 7,0 por 2 minutos (Figura 2). Um branco analítico foi conduzido seguindo exatamente o mesmo protocolo substituindo as soluções de proteína por água ultrapura.



**Figura 2.** Agitador rotativo para tubos Falcon (Criemaq C-385).  
**Fonte:** Arquivo pessoal.

### 3.2.2. Fase Gástrica

Em seguida, foi adicionado 8 mL de fluido gástrico simulado (KCl 6,9 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 25 mmol/L, NaCl 47,2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0,1 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 mmol/L) e o pH foi ajustado para 3,0 com HCl 3M. Em seguida, foram adicionados 5 µL de CaCl<sub>1</sub> 0,3 mol/L e pepsina (2000 U/mL). O volume foi ajustado com água ultrapura para atingir 10 mL de fluidos adicionados durante a fase gástrica e a solução foi incubada em estufa BOD sob agitação com auxílio de um agitador rotativo a 37°C por 2 horas.

### 3.2.3. Fase Intestinal

Concluída a fase gástrica, foram adicionados ao quimo 8 mL de fluido intestinal simulado (KCl 6,8 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 85 mmol/L, NaCl 38,4 mmol/L,

MgCl<sub>2</sub> 0,33 mmol/L) e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5M. Em seguida, adicionou-se 3 mL de solução de bile em concentração para atingir 10 mM na fase intestinal, 0,04 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,3 mol/L e 5 mL de suspensão de pancreatina em concentração para atingir 100 U/mL na fase intestinal. O volume foi ajustado para 20 mL de fluidos com água ultrapura durante a fase intestinal e a solução foi novamente incubada em uma estufa BOD sob agitação, a 37°C por 2 horas

#### **3.2.4. Tratamento de amostra após a digestão**

Ao final da fase intestinal todo o conteúdo foi recuperado e adicionado 4 mL de solução de Bowman-Birk (BBI), inibidor de protease com atividade antiqumotripsina e antitripsina, para inativação da atividade enzimática, e foram refrigerados em banho de gelo. Posteriormente centrifugado (4000 g por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi ultrafiltrado em filtro centrífugo com peso molecular de corte de 3 kDa (Merck Millipore, Cork, Irlanda). Em seguida, o ultrafiltrado foi esterilizado a frio com o auxílio de filtros de seringas estéreis de 0,22 µm (Cod-SLGVR33RS - Millex 33mm PVDF), acondicionados em tubos eppendorf estéreis e congelados até momento do uso. Os digeridos foram adicionados ao meio de cultura para avaliar seu potencial em favorecer o crescimento de culturas puras de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus casei* e *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

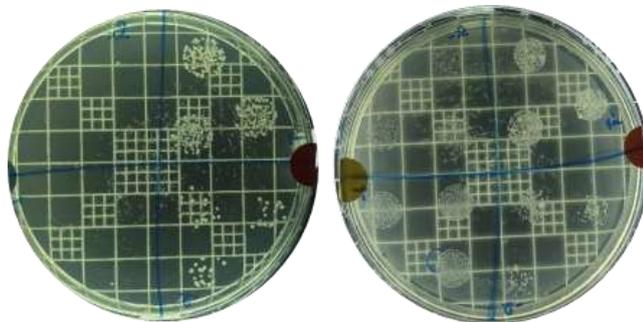
### **3.3. Ativação das cepas probióticas e esterilização dos meios de cultura**

Cepas comerciais liofilizadas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*- BLCl, (SACCO srl- C213990A), *Lactobacillus helveticus* LH-B02 (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca), *Lacticaseibacillus casei*- 01 (Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil) e *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil), foram ativadas em caldo Man Rogosa e Sharpe (MRS) suplementados com 0,5 g/L de cloridrato de cisteína e 0,1 g/L de tioglicolato de sódio, por duas vezes consecutivas a 37 ± 1°C/24h em estufa BOD (Figura 1) (Zhang, et al., 2023). A esterilização do caldo MRS suplementado foi realizada a 121°C por 15 min em autoclave horizontal (Ortosintese Industria e Comercio Ltda., Modelo-AC 127).

### 3.4. Avaliação do efeito dos digeridos proteicos obtidos após digestão gastrointestinal *in vitro* no crescimento de microrganismos probióticos

Após a ativação, 10 µL do caldo com as cepas ativadas de cada microrganismo foram inoculadas em 5 mL de diferentes meios de cultura: caldo MRS suplementado (Controle 1), caldo MRS suplementado adicionado de 2% do prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS) (Controle 2), caldo MRS suplementado com 2% do digerido obtidos após digestão e de branco analítico da digestão, caseinato de cálcio, isolado proteico de soro, concentrado proteico ervilha, isolado proteico de soja após simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal (Figura 1), que foram incubados a 37°C/24 h.

O crescimento de microrganismos pode ser acompanhado de diferentes formas, sendo mais comuns são a densidade ótica (DO) e a contagem total em placa (UFC/mL). A densidade ótica fornece uma medida indireta e contínua da turbidez, sem distinção entre células vivas e mortas, enquanto a contagem de UFC/mL oferece uma medida direta das células viáveis. Neste trabalho, o crescimento dos microrganismos foi acompanhado por turbidimetria a 660 nm (DO660) conforme descrito por Yu, et al. (2016), com modificações, utilizando espectrofotômetro UV-Visível (Orion AquaMate 8000) e por contagem padrão em placas, utilizando o método de plaqueamento em gotas (Figura 3). As placas foram incubadas a 37°C em jarras de anaerobiose. O plaqueamento realizado em triplicata e os resultados foram expressos em Log UFC/mL (Vinderola; Reinheimer, 1999). Em ambos os casos, o crescimento dos microrganismos foi avaliado após 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 e 48 horas de incubação.



**Figura 3.** Contagem padrão em placas, utilizando o método de plaqueamento em gotas (Drop plate) dos microrganismos probióticos.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

### **3.5. Capacidade Antioxidante**

A capacidade antioxidante da dispersão proteica e dos digeridos obtidos após a digestão e previamente tratados foi avaliada por meio de três métodos: capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH), poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). Os resultados foram expressos em mg equivalente de Trolox (TE) por mL de amostra.

#### **3.5.1. DPPH (Free radical scavenging capacity)**

A capacidade de sequestro de radicais livres das dispersões proteicas e dos digeridos ultrafiltrados foi determinada pelo método descrito por Brand-Williams et al. (1995) com modificação. O radical DPPH foi dissolvido em metanol na concentração de 60  $\mu$ M, e a solução devidamente homogeneizada e armazenada em frascos escuros, sendo utilizada exclusivamente no dia da análise. Para o ensaio, que ocorreu em triplicata, alíquotas de 100  $\mu$ L de amostra (dispersões proteicas 10% e digeridos ultrafiltrados) foram acondicionados em frascos contendo 3,9 mL da solução de DPPH (60  $\mu$ M) e homogeneizadas. Após 60 minutos de reação em ambiente escuro à temperatura ambiente, a capacidade sequestrante foi determinada espectrofotometricamente em um leitor de microplacas FLUOstar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha) a 515 nm. Como branco analítico foi utilizado o metanol e a curva padrão foi construída utilizando Trolox com concentrações variando de 0,01 a 0,25 mg/mL.

#### **3.5.2. FRAP (Ferric reducing antioxidante power)**

A capacidade antioxidante por FRAP das dispersões (10%) e dos digeridos ultrafiltrados foi determinada em triplicata, pelo método descrito por Benzie e Strain (1996), com modificações. Primeiramente, foi preparada a solução FRAP, utilizando 20 mL de tampão de acetato (0,3 M, pH 3,6), 2 mL de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (10 mM) e 2 mL de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) (20 mM). Em seguida, 25  $\mu$ L do extrato diluído e 175  $\mu$ L da solução FRAP foram adicionadas a microplaca transparente de 96 poços que foram mantidos em ambiente escuro à 37 °C/30 minutos. Em seguida, a absorbância foi medida a 595 nm em um leitor de microplacas FLUOstar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha). A curva de calibração foi feita com diferentes diluições de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) em concentrações de 0,01 a 0,06 mg/mL.

#### **3.5.3. ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)**

A capacidade antioxidante por ORAC das dispersões proteicas (10%) e dos digeridos ultrafiltrados foram determinados em quadruplicata, pelo método descrito por Dávalos et al. (2004), com modificações. Inicialmente, 25 µL da amostra e 150 µL de fluoresceína diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) foi adicionado em microplaca de 96 poços com fundo preto. Em seguida, a microplaca foi colocada no leitor de microplacas FLUOstar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha) por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, adicionaram-se 25 µL de 2,2'-azobis (2-metilpropanamida) di-hidrocloro (AAPH) (0,108 g/mL) e a fluorescência foi medida a cada 1 minuto, durante um total de 101 minutos. O leitor de microplacas foi ajustado para filtros de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. A curva de calibração foi feita com diferentes diluições de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) e tampão fosfato (pH = 7,4) em concentrações de 5 a 25 µg/mL.

### 3.6. Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental utilizado para avaliar o crescimento e viabilidade foi um esquema fatorial 7x9, em blocos completamente casualizados com três repetições. O efeito dos tratamentos (7 níveis de variação: caseinato de cálcio, isolado proteico de soro, ervilha, soja e branco da digestão, MRS e FOS), do tempo de incubação (9 níveis de variação: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 e 48 horas), bem como a interação desses fatores sobre o crescimento pela mediante a densidade ótica e a viabilidade por contagem padrão em placas dos microrganismos *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus casei* e *Lacticaseibacillus rhamnosus*, que foram avaliados por análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey considerando o nível de significância de 5%.

Os dados da atividade antioxidante foram avaliados por análise de variância, sendo as médias avaliadas pelo Teste de Tukey a 5%. Todos os dados foram tratados utilizando o software Statistica 12.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização das fontes proteicas

A composição centesimal das fontes proteicas utilizada está apresentada no Quadro 1.

**Quadro 1.** Composição centesimal do caseinato de cálcio, isolado proteico do soro, concentrado proteico de ervilha e isolado proteico de soja.

Determinações Analíticas	Fontes proteicas			
	Caseinato de Cálcio	Isolado proteico de soro	Concentrado proteico de ervilha	Isolado proteico de soja
Sólidos totais (%)	97.07 ± 0.7	97.70 ± 0.03	91.57 ± 0.06	95.05 ± 0.1
Proteína (%)	91.20 ± 0.4	87.69 ± 0.1	64.97 ± 0.3	78.67 ± 0.7
Gordura (%)	0.94 ± 0.02	0.69 ± 0.01	8.75 ± 0.04	4.36 ± 0.05
Cinzas (%)	3.87 ± 0.03	2.65 ± 0.02	5.01 ± 0.03	3.73 ± 0.05
Carboidrato* (%)	1.04	6.67	12.83	8.29

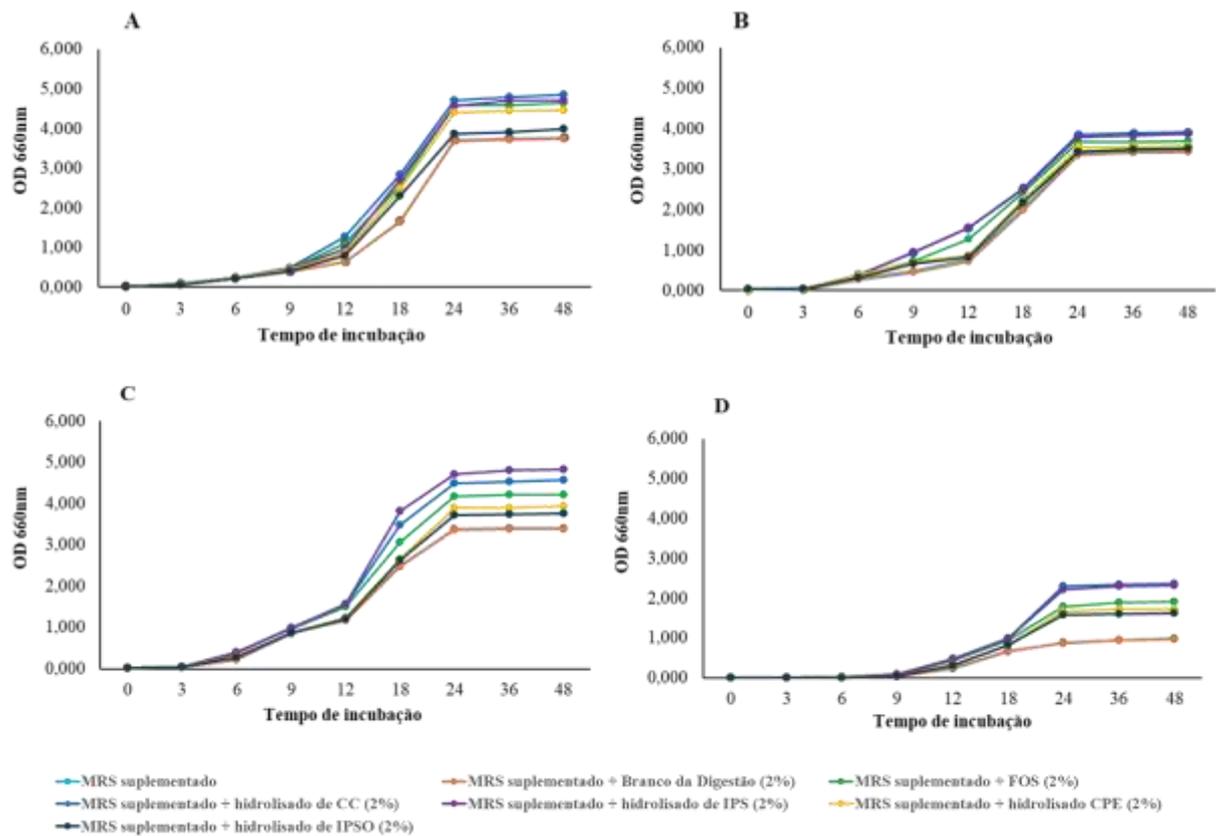
\*Calculado por diferença entre o teor de sólidos totais e os demais constituinte.

O teor de proteínas das fontes utilizadas variou de 91,20 a 64,97%, sendo que o caseinato de cálcio apresentou o maior teor e o concentrado proteico de ervilha o menor teor de proteínas. Observa-se no Quadro 1 que os demais constituintes também apresentam diferença nos seus teores.

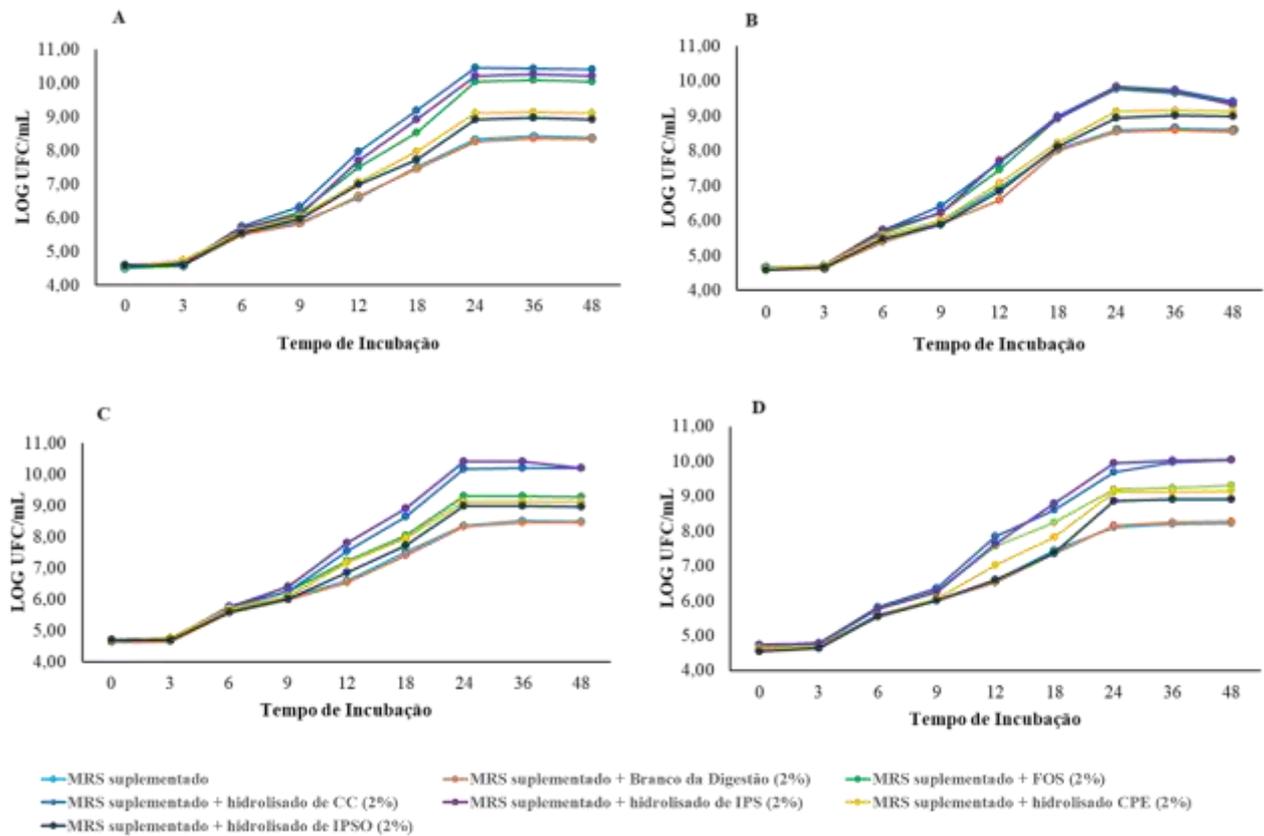
### 4.2 Crescimento e viabilidade dos probióticos suplementados com diferentes hidrolisados

As Figuras 4 e 5 apresentam as curvas de crescimento de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (A), *Lacticaseibacillus casei* (B), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (C) e *Lactobacillus helveticus* (D) nos diferentes meios de cultivo durante 48 horas de incubação, avaliado por densidade óptica (OD) a 660 nm e contagem total em placas (UFC/mL), respectivamente. As curvas de crescimento de todos os microrganismos nos diferentes meios de cultivos evidenciam um comportamento clássico, com fase lag, log e estacionária. Quando avaliado por densidade óptica (Figura 4), todos os microrganismos, exceto o *Lactobacillus helveticus*, sugerem uma transição da fase lag para a fase log após 6 h de incubação. Esse tempo é de 9 h para o *Lactobacillus helveticus*. Quando avaliados pela contagem da UFC/mL (Figura 5) todos os microrganismos iniciam o crescimento após 3 h de incubação.

Independente do comportamento, as curvas de crescimento sugerem que fase estacionária para todos os microrganismos nos diferentes meios de cultivo foi alcançada após 24 horas de incubação em ambas as formas de avaliar o crescimento.



**Figura 4.** Curva de crescimento avaliada por densidade ótica a 660 nm do *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (A), *Lactocaseibacillus casei* (B), *Lactocaseibacillus rhamnosus* (C) e *Lactobacillus helveticus* (D) em diferentes meios de cultivo.



**Figura 5.** Curva de crescimento avaliada contagem total em placas (UFC/mL) do *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (A), *Lacticaseibacillus casei* (B), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (C) e *Lactobacillus helveticus* (D) em diferentes meios de cultivo.

O efeito dos tratamentos, do tempo de incubação, bem como da interação desses fatores sobre o crescimento (Densidade Ótica 660 nm) e a contagem total de células viáveis (Log UFC/mL) dos microrganismos probióticos são apresentados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

**Quadro 2.** Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito dos tratamentos, tempo de incubação, bem como a interação desses fatores sobre o crescimento dos microrganismos probióticos.

Fatores	Grau de Liberdade	Densidade ótica (660 nm)			
		<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Tratamentos*	6	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Tempo**	8	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Tratamento x Tempo	48	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

\*Tratamentos: Hidrolisados obtidos após digestão simulada de caseinato de cálcio, isolado proteico de soro, concentrado proteico de ervilha, isolado proteico de soja.

\*\*Tempo de incubação (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 e 48 horas)

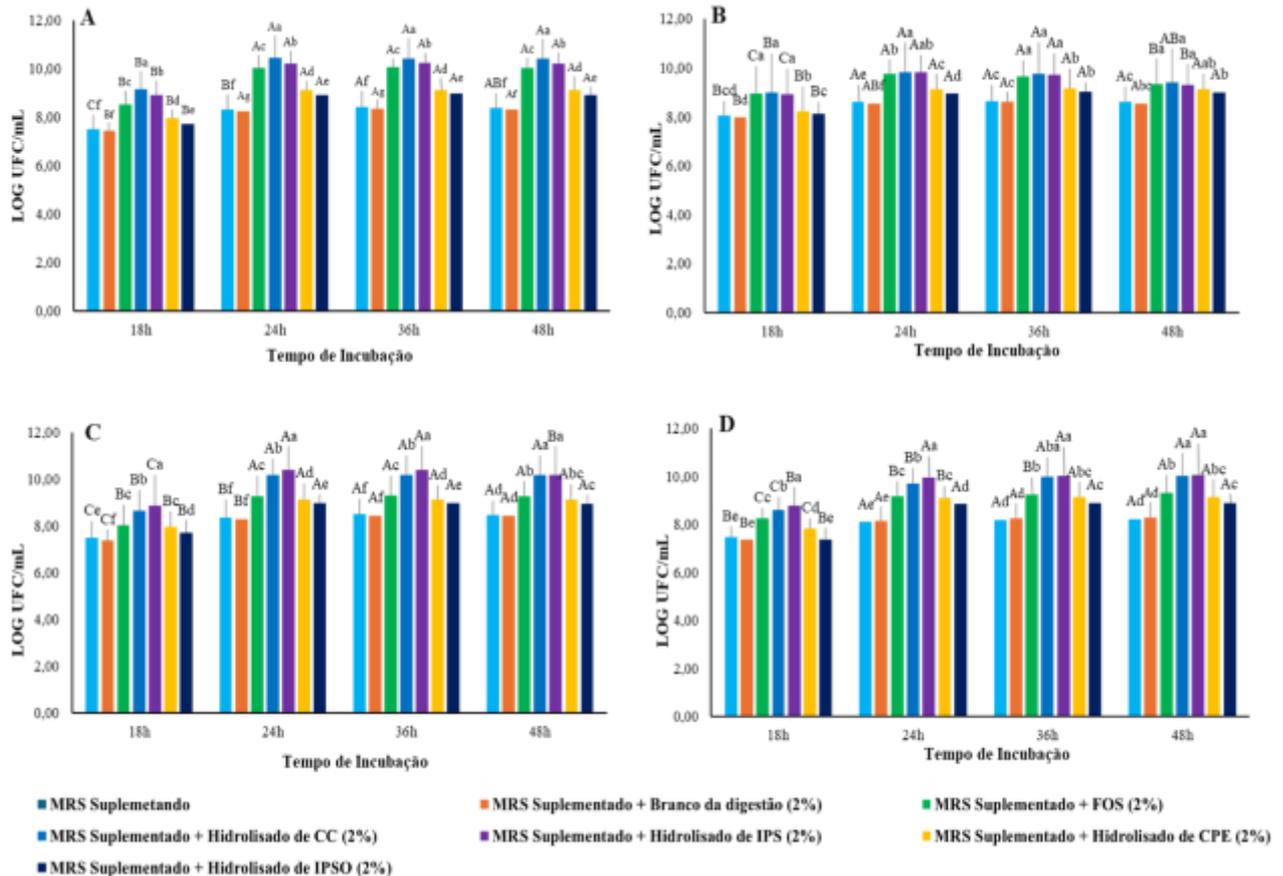
**Quadro 3.** Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito dos tratamentos, tempo de incubação, bem como a interação desses fatores sobre a viabilidade dos microrganismos probióticos.

Fatores	Grau de Liberdade	Log UFC/mL			
		<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Tratamentos*	6	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Tempo**	8	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Tratamento x Tempo	48	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

\*Tratamentos: Hidrolisados obtidos após digestão simulada de caseinato de cálcio, isolado proteico de soro, concentrado proteico de ervilha, isolado proteico de soja.

\*\*Tempo de incubação (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 e 48 horas)

Observa-se nas Tabelas 2 e 3 que os tratamentos, o tempo de incubação e a interação entre os dois fatores influenciaram significativamente o crescimento dos microrganismos probióticos. Os gráficos completos do efeito da interação entre os tratamentos e o tempo de incubação para cada microrganismo, avaliados através da densidade ótica (DO) e a contagem de UFC/mL são apresentados no Anexo 1. Considerando que a avaliação por contagem de UFC/mL é uma medida direta e confiável das células viáveis, e que a fase estacionária para todos os microrganismos, nos diferentes meios de cultivos, possivelmente foi alcançada após 24 horas de incubação, optou-se por apresentar e discutir os resultados do efeito da interação entre os tratamentos e o tempo de incubação utilizando a contagem de UFC/mL após 18 h de incubação (Figura 6).



Letras minúsculas indicam diferença significativa a 5% entre os tratamentos para o mesmo período.

Letras maiúsculas indicam diferença significativa a 5% entre períodos para o mesmo tratamento

**Figura 6.** Efeito da interação entre os tratamentos e o tempo de incubação na contagem de UFC/mL de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (A), *Lacticaseibacillus casei* (B), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (C) e *Lactobacillus helveticus* (D).

Inicialmente, observa-se na Figura 6 que existe diferença significativa na contagem de todos os microrganismos entre 18 e 24 h de incubação para todos os meios de cultivos avaliados. Além disso, pode-se observar que entre 24 e 48 h não houve mais crescimento significativo de nenhum microrganismo, indicando, conforme sugeridos nas Figuras 4 e 5, que após 24 horas se alcançou a fase estacionária, que é caracterizada pelo equilíbrio entre divisão celular e mortalidade das células bacterianas que ocorre devido ao consumo de nutrientes ou acúmulo de metabólitos tóxicos (Alterthum & Rácz, 2008). Redução significativa na contagem de *Lacticaseibacillus rhamnosus* no meio adicionado de digerido obtido após digestão de IPS e de *Lacticaseibacillus casei* no meio adicionado de FOS e de digerido obtido após digestão de CPE foi observada após 48 h.

Observa-se que todos os microrganismos apresentam crescimento significativamente maior quando cultivados nos meios adicionados de digeridos de proteínas lácteas (CC e IPS)

do que no meio adicionado de FOS e nos meios adicionados de digeridos obtidos após digestão de proteínas vegetais (CPE e IPSO).

Por outro, de forma geral, os microrganismos apresentam crescimento significativamente menor quando cultivados nos meios adicionados de digeridos obtidos após digestão de proteínas vegetais (CPE e IPSO) do que no meio adicionado de FOS, com exceção do *Lactobacillus helveticus*, cujo crescimento não diferiu significativamente do meio contendo FOS.

Embora os digeridos obtidos das proteínas vegetais (CPE e IPSO) apresentarem um crescimento significativamente menor em comparação aos digeridos obtidos após a digestão de proteínas lácteas (CC e IPS) e ao FOS, com exceção do *Lactobacillus helveticus* no meio de cultivo contendo CPE, os resultados observados para as proteínas vegetais foram significativamente superiores ao meio MRS suplementado (controle). Indicando que os digeridos vegetais favorecem o crescimento microbiano, ainda que de forma menos significativa que os digeridos de proteínas lácteas. Sugerindo que os nutrientes presentes nesses meios são menos biodisponíveis ou que os microrganismos apresentam menor aptidão para utilizar os compostos disponíveis.

Vale ressaltar que a preferência dos microrganismos por digeridos obtidos de proteínas lácteas em comparação ao digeridos obtidos após digestão de proteínas vegetais neste trabalho, pode estar relacionada à razão pela qual as cepas utilizadas serem culturas lácteas comerciais utilizadas para produtos lácteos. As proteínas vegetais possuem estruturas específicas e podem conter fatores antinutricionais que dificultam a ação dos microrganismos. Por exemplo, inibidores de proteases, amplamente distribuídos no reino vegetal, são proteínas capazes de inibir atividades enzimáticas essenciais, como a tripsina e a quimotripsina, podendo interferir na digestão e na absorção de nutrientes e, como consequência, na disponibilidade desses compostos para utilização dos microrganismos (Samtiya et al., 2020). Além disso, esses fatores antinutricionais atuam como mecanismos de defesa das plantas contra fungos, bactérias, insetos e animais, o que podem dificultar a ação de microrganismos (Liener, 1976; Görgüç et al., 2020; Ajomiwe et al., 2024).

Uma outra hipótese é que o maior estímulo do crescimento dos microrganismos pelos digeridos lácteos pode estar relacionado ao perfil de aminoácidos das proteínas lácteas, que podem atender de forma mais adequada às demandas metabólicas dos microrganismos avaliados, que são culturas adaptadas às matrizes lácteas. Em contraste, as proteínas vegetais, que embora sejam alternativas viáveis, apresentam limitações devido à presença de fatores antinutricionais e à composição de aminoácidos menos balanceados, o que pode comprometer

a eficiência do metabolismo bacteriano (Görgüç et al., 2020). Assim, a composição específica de aminoácidos nas proteínas lácteas parece favorecer um desenvolvimento mais eficiente dos microrganismos.

Yu, et al. (2016) apresentou resultados que sugerem um impacto positivo do extrato de peptídeos do soro do leite no crescimento de probióticos e na modulação da microbiota intestinal em ratos. Os peptídeos derivados do soro mostraram-se altamente eficazes como substratos para o crescimento de microrganismos probióticos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, promovendo maior viabilidade e atividade metabólica em comparação a outros suplementos. Além disso, o estudo destacou que esses peptídeos influenciam positivamente a composição da microbiota intestinal, favorecendo a abundância de bactérias benéficas e contribuindo para o equilíbrio do microbioma. Esses achados reforçam o potencial das proteínas lácteas hidrolisadas como ingredientes funcionais em formulações alimentares voltadas à saúde intestinal.

### 4.3 Capacidade Antioxidante

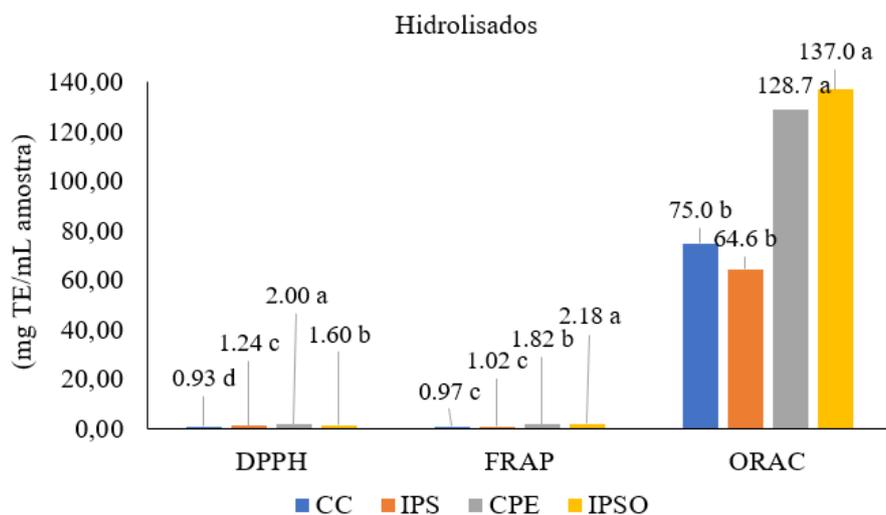
A determinação da capacidade antioxidante em alimentos é uma ferramenta importante para estimar a presença de compostos bioativos com potencial de neutralizar radicais livres. Esses compostos podem contribuir para a proteção do organismo contra o estresse oxidativo, um fator relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas. Essa avaliação é frequentemente realizada por métodos *in vitro* como DPPH, ABTS, FRAP e ORAC, que medem a eficiência dos antioxidantes em diferentes condições. A capacidade antioxidante está diretamente relacionada à qualidade nutricional dos alimentos e ao potencial de prevenção de doenças crônicas, sendo influenciada pela presença de compostos fenólicos, vitaminas, carotenoides e outros bioativos. Esses dados são fundamentais no quando se pensa no desenvolvimento de alimentos funcionais e no estudo de sua estabilidade durante o processamento e armazenamento (Ferrari, 2010).

Os valores observados para o método DPPH (Figura 7) indicam que o hidrolisado obtido após a digestão de CPE apresentou a maior atividade antioxidante (2,00 mg TE/mL), enquanto o hidrolisado obtido após a digestão de CC demonstrou o menor valor (0,93 mg TE/mL). Esses resultados sugerem que a composição de aminoácidos e peptídeos do CPE pode conferir maior capacidade de neutralizar radicais livres como hidroxila e superóxido neste sistema. De acordo com Görgüç *et al.* (2020), proteínas vegetais hidrolisadas, especialmente derivadas de leguminosas, apresentam atividade antioxidante mais pronunciada em comparação às proteínas animais. *et al.*,

No método FRAP, que avalia a capacidade de redução de ferro, observou-se que o digerido obtido após a digestão de IPSO apresentou a maior atividade antioxidante (2,18 mg TE/mL), seguido pelo CPE (1,82 mg TE/mL). Novamente, o digerido obtido após a digestão de CC exibiu o menor valor (0,97 mg TE/mL). Essa tendência pode ser atribuída à presença compostos fenólicos nas proteínas vegetais, são conhecidos por seu potencial antioxidante, como reportado por Pan et al., (2020), que destacaram a superioridade de proteínas vegetais hidrolisadas em sistemas de redução.

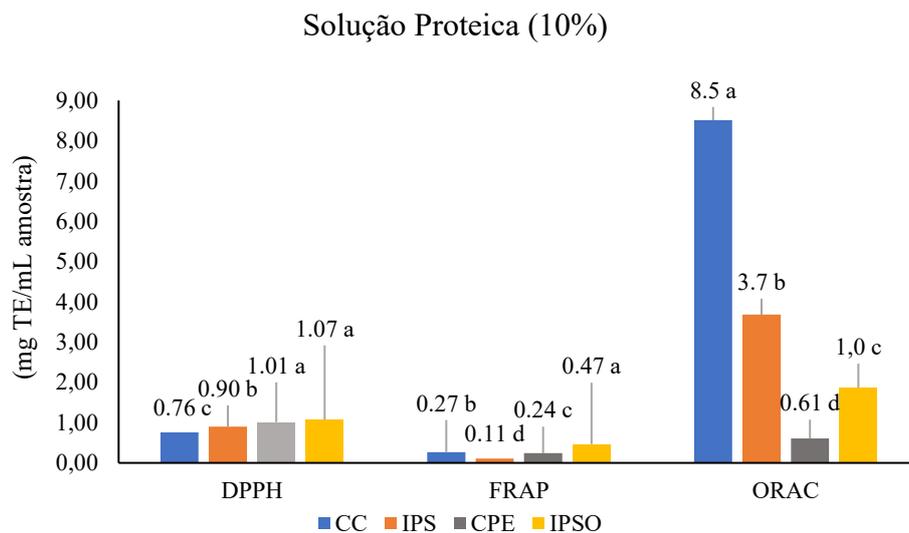
No método ORAC, o digerido obtido após a digestão de IPSO obteve o maior valor (137,0 mg TE/mL), seguido pelo digerido obtido após a digestão de CPE (128,7 mg TE/mL). O digerido obtido após a digestão de CC e IPS apresentaram valores significativamente menores, sendo 75,0 e 64,6 mg TE/mL, respectivamente. O método ORAC, por sua capacidade de medir a proteção contra radicais peroxila, parece destacar a superioridade antioxidante das proteínas vegetais.

Em termos gerais, os resultados indicam que os digeridos obtidos após a digestão de proteínas vegetais (CPE e IPSO) possuem maior atividade antioxidante em todos os métodos analisados, destacando o potencial funcional desses ingredientes na formulação de alimentos com propriedades antioxidantes. Isso está alinhado com a tendência de explorar proteínas vegetais como fontes de compostos bioativos, dada a crescente demanda por produtos alimentícios sustentáveis e saudáveis.



Letras minúsculas indicam diferenças significativas ao nível de 5% entre as amostras analisadas dentro de cada método utilizado.

**Figura 7.** Capacidade antioxidante nos digeridos proteicos obtidos após a digestão pelos métodos de DPPH, FRAP e ORAC.



Letras minúsculas indicam diferenças significativas ao nível de 5% entre as amostras analisadas dentro de cada método utilizado.

**Figura 8.** Capacidade antioxidante na solução de 10 % de proteína antes da digestão gastrointestinal pelos métodos de DPPH, FRAP e ORAC.

Hidrolisados de proteínas de soja e ervilha têm sido amplamente reportados como fontes de atividade antioxidante (Chen et al., 2018; Pena-Ramos & Xiong, 2002; Beerman et al., 2009). A hidrólise enzimática é um processo chave para esse efeito, pois reduz a massa molecular dos hidrolisados, aumenta o número de grupos ionizáveis e expõe grupos hidrofóbicos, o que contribui significativamente para a atividade antioxidante (Jung et al., 2005).

Os compostos fenólicos, amplamente reconhecidos como antioxidantes naturais, desempenham um papel essencial na proteção contra doenças, incluindo o câncer e diversas condições inflamatórias. Dueñas et al., (2004) confirmaram a presença de compostos fenólicos no tegumento e no cotilédone das ervilhas. Adicionalmente, o estudo de Troszynska & Ciska (2002) comparou a composição fenólica e a atividade antioxidante de ervilhas brancas e coloridas. Esses autores relataram que os compostos fenólicos estavam presentes tanto na forma livre quanto na forma esterificada, mas as concentrações mais elevadas foram encontradas em variedades coloridas.

Entre os compostos fenólicos, os taninos se destacam por sua elevada atividade antioxidante (Hagerman et al., 1998). Esses estudos oferecem suporte à hipótese de que a maior atividade antioxidante observada em proteínas vegetais está diretamente relacionada à presença de compostos fenólicos e à sua composição específica.

## 5 CONCLUSÕES

Digeridos obtidos após a digestão de proteínas lácteas (CC e IPS) foram significativamente superiores como fonte prebiótica em meios enriquecidos destacando a superioridade das proteínas lácteas na promoção do desenvolvimento das cepas probióticas. Sugerindo que elas forneçam nutrientes mais biodisponíveis para os microrganismos, enquanto os digeridos de proteínas vegetais apresentam limitações, possivelmente devido à presença de fatores antinutricionais e menor disponibilidade de aminoácidos essenciais.

Os digeridos obtidos após a digestão de proteínas vegetais (CPE e IPSO) favorecem o crescimento microbiano quando comparado ao meio controle, embora de forma menos significativa em comparação aos hidrolisados de proteínas lácteas.

Atualmente, há uma crescente investigação por ingredientes proteicos vegetais que sejam fonte de compostos bioativos e apresentem atividade antioxidante. No presente trabalho, verificamos que os digeridos de proteínas vegetais (CPE e IPSO) demonstram maior atividade antioxidante em todos os métodos avaliados, evidenciando o potencial funcional desses ingredientes na elaboração de alimentos com propriedades antioxidantes que busca explorar proteínas vegetais como fontes de compostos bioativos, atendendo à crescente demanda por produtos alimentícios mais sustentáveis e saudáveis.

Entretanto, são necessários estudos futuros para aprofundar a compreensão dos impactos das proteínas vegetais na composição e na funcionalidade da microbiota intestinal.

## 6 REFERÊNCIAS

AJOMIWE, N.; BOLAND, M.; PHONGTHAI, S.; BAGIYAL, M.; SINGH, J.; & KAUR, L. Protein Nutrition: Understanding Structure, Digestibility, and Bioavailability for Optimal Health. **Foods**, v. 13, n. 11, p. 1771, 2024.

ALMEIDA, C. C. D.; JÚNIOR, C. C.; SILVA, A. C., & ALVARES, T. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia biosfera** v. 9, n. 16, p. 15, 2013.

ALTAF, M.; NAVEENA, B.J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V.; REDDY, G. Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract – Optimization by RSM. **Process Biochem.** v. 41. p.465–472, 2006.

ALTERTHUM, F., & RÁCZ, M. L. **Microbiologia**-Trabulsi Alterthum 6ª Ed.-Ebook, 2008.

AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2006.

AZAD, M. A. K.; SARKER, M.; LI, T. & YIN, J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **BioMed Research International**. Hindawi Limited, 2018.

BAILEY, H. M.; STEIN, H. H. Raw and roasted pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) are ‘good’ sources of protein based on their digestible indispensable amino acid score as determined in pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 10, p. 3878–3885, 1 ago. 2020.

BARBOSA, G. J.; ARRIEL, N. H. C. Feijão-Fava E A Agricultura Familiar De Serraria-PB. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 35, n. 3, p. 387-403, 2019.

BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M., & GENOVESE, M. I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. **Food chemistry**, v. 98, n. 4, p. 757-766, 2006.

BERRAZAGA, I.; MICARD, V.; GUEUGNEAU, M.; & WALRAND, S. The role of the anabolic properties of plant-versus animal-based protein sources in supporting muscle mass maintenance: a critical review. **Nutrients**, 1 ago. 2019.

BLIGH, E.G.; & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOHN, T.; CARRIERE, F.; DAY, L.; DEGLAIRE, A.; EGGER, L.; FREITAS, D.; & DUPONT, D. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Taylor and Francis Inc., 2 set. 2018.

BOLAND, M. Human digestion - a processing perspective. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. John Wiley and Sons Ltd, 1 maio 2016.

BOTTARI, B.; QUARTIERI, A.; PRANDI, B.; RAIMONDI, S.; LEONARDI, A.; ROSSI, M.; & AMARETTI, A. Characterization of the peptide fraction from digested Parmigiano Reggiano cheese and its effect on growth of lactobacilli and bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 255, p. 32–41, 16 ago. 2017.

BOYE, J.; ZARE, F.; & PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, 43, 414–431, 2010.

BRODKORB, A; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R., BALLANCE, S.; ... & RECIO, I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 1 abr. 2019.

BUTEL, M. J. “Probiotics, gut microbiota and health,” *Medecine et Maladies Infectieuses*, vol. 44, no. 1, pp. 1–8, 2014.

CASTRO, R. J. S., & SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, 74, 185-198, 2015.

CHALUPA-KREBZDAK, S., LONG, C. J., & BOHRER, B. M. Nutrient density and nutritional value of milk and plant based milk alternatives. **International Dairy Journal**, 87, 84-92, 2018.

CHARDIGNY, J. M.; WALRAND, S. Plant protein for food: Opportunities and bottlenecks. **OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 23, n. 4, 1 jul. 2016.

CHERNOFF, R. Effects of aging on the digestive system. In: **A Comprehensive Guide to Geriatric Rehabilitation**. [s.l.] Elsevier, p. 45–49, 2015.

CHIANG, J. H.; TAY, W.; ONG, D. S. M.; LIEBL, D.; NG, C. P. & HENRY, C. J. Physicochemical, textural and structural characteristics of wheat gluten-soy protein composited meat analogues prepared with the mechanical elongation method. **Food Structure**, v. 28, p. 100183, 2021.

CONDEZO, H. L. & NORATTO, G. Aged American cheddar cheese as source of protein derived compounds that modulate obese mice fecal bacteria and colon inflammation in vitro. **Symbiosis** 4 (5), 1–10, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira grãos**, v. 7 – safra 2019/20 – Décimo primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, agosto 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira grãos**, v. 7 – safra 2023/24 – Décimo primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, agosto 2020.

CORNET, S. H.; SNEL, S. J.; LESSCHEN, J.; VAN DER GOOT, A. J.; & VAN DER SMAN, R. G.. Enhancing the water holding capacity of model meat analogues through marinade composition. **Journal of Food Engineering**, v. 290, p. 110283, 2021.

COSTA, F. R.; MARICATO, E.; DIAS, A. M. N., & BAPTISTA, E. B. Proteínas do soro do leite: propriedades funcionais e benefícios para a saúde humana. **Lecturas: Educación Física y Deportes**, v. 25, n. 272, 2021.

DA SILVA, A. M. M.; ALMEIDA, F. S.; & SATO, A. C. K. Functional characterization of commercial plant proteins and their application on stabilization of emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 292, p. 110277, 2021.

DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 449–467, abr. 2012.

DANIELS, N.W.R.; FRAZIER, P.J. Wheat proteins – Physical properties and baking function. In: Plant proteins. G. Norton. Department of applied Biochemistry and nutrition. **University of Nottingham School of Agriculture**. Butterworths. n.18, p.352, 1997.

DAY, L. Proteins from land plants –Potential resources for human nutrition and food security. **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, n. 1, p. 25-42, 2013.

DAY, L.; RAYNES, JK; LEIS, A.; LIU, LH.; E WILLIAMS, R.P.W. Probing the internal and external micelle structures of differently sized casein micelles from individual cows milk by dynamic light and small-angle X-ray scattering. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 150–163, 1 ago. 2017.

D'ALESSIO, G.; IERVESE, F.; VALBONETTI, L.; FAIETA, M.; PITTIA, P.; & DI MATTIA, C. D. Tailoring pea proteins gelling properties by high-pressure homogenization for the formulation of a model spreadable plant-based product. **LWT**, v. 207, p. 116627, 2024.

DING, T., & LI, Y. The beneficial effect of whey protein hydrolysate on *Lactobacillus acidophilus* JC1. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, v. 21, p. 54–61, 2021.

DOS REIS, T. N.; LIMA, M. G. B.; LOPES, G. R., & MEYFROIDT, P. Not all supply chains are created equal: The linkages between soy local trade relations and development outcomes in Brazil. **World Development**, v. 175, p. 106475, 2024.

DUPONT, D.; TOMÉ, D. Milk proteins: Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. In: **Milk Proteins**, cap. 20, p.701-714, 2020.

FAO, 2013. Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition Report of an FAO Expert Consultation. March 31–April 2, 2011, Auckland, New Zealand. FAO, Rome, Italy. **Food and Nutrition Paper 92**.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E.; CREAMER, L.K.; & SWAISGOOD, H.E. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641–1674, 2004.

FERAWATI, F.; ZAHARI, I.; BARMAN, M.; HEFNI, M.; AHLSTRÖM, C.; WITTHÖFT, C.; & ÖSTBRING, K. High-moisture meat analogues produced from yellow pea and faba

bean protein isolates/concentrate: Effect of raw material composition and extrusion parameters on texture properties. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 843, 2021.

FERRARI, C. K. B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **J Health Sci Inst**, v. 28, n. 4, p. 307-10, 2010.

FILGUEIRA, F. A. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **Universidade Federal de Viçosa**, 2000.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, London, v.17, p.711-724, 2003.

FOX, P.F.; T. UNIACKE-LOWE, MCSWEENEY, P.L.H.; O'MAHONY, J.A. **Dairy Chemistry and Biochemistry**; Ed. 2th, Springer International Publishing, p. 547, 2015.

GILBERT, J. A.; BENDSEN, N.T.; TREMBLAY, A.; & ASTRUP, A. Effect of proteins from different sources on body composition. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. SUPPL. 2, set. 2011.

GORISSEN, S. H. M.; CROMBAG, J. J.; SENDEN, J. M.; WATERVAL, W. H.; BIERAU, J.; VERDIJK, L. B.; & VAN LOON, L. J. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. **Amino Acids**, v. 50, n. 12, p. 1685–1695, 1 dez. 2018.

GOULDING, D. A.; FOX, P. F.; O'MAHONY, J. A. Milk proteins: An overview. In: (Ed.). **Milk Proteins**, cap. 2, p.21-98, 2020.

GUERRA, A.; ETIENNE-MERMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestine digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p.591-600, 2012.

GÖRGÜÇ, A.; GENÇDAĞ, E.; & YILMAZ, F. M. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments—A review. **Food Research International**, v. 136, p. 109504, 2020.

HAGERMAN, A. E. RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; & RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics

(tannins) as biological antioxidants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1887-1892, 1998.

HE, M., & SHI, B. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. **Cell & bioscience**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

HERNÁNDEZ, M.; LAVEJA, A.; SOTELO, A. Determination de la digestibilidad proteínica in vitro in vivo en cereais y leguminosas, crudos e cocidos. **Arch.Latinoam.Nutr.**, v. 34, n.3, p. 513-522, 1984.

HERREMAN, L.; NOMMENSEN, P.; PENNING, B.; & LAUS, M. C. Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5379–5391, 1 out. 2020.

HODGKINSON, S. M.; MONTOYA, C. A.; SCHOLTEN, P. T.; RUTHERFURD, S. M.; & MOUGHAN, P. J. Cooking Conditions Affect the True Ileal Digestible Amino Acid Content and Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) of Bovine Meat as Determined in Pigs. **Journal of Nutrition**, v. 148, n. 10, p. 1564–1569, 1 out. 2018.

HOEHNEL, A.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Targeted formulation of plant-based protein-foods: Supporting the food system's transformation in the context of human health, environmental sustainability and consumer trends. **Trends in Food Science and Technology**. Elsevier Ltd, , 1 out. 2022.

HUPPERTZ, THOM; CHIA, LOO WEE. Milk protein coagulation under gastric conditions: A review. **International Dairy Journal**, v. 113, p. 104882, 2021.

IBRAHIM, S.A. & BEZKOROVAINY, A. Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. **Journal Food Science**. V. 59, n. 1, p. 189–191, 1994.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of functional foods**, v. 1, n. 2, p. 177-187, 2009.

LAMBRECHT, D. M.; DIEHL, M. I.; LUCIO, A. D. C.; TISCHLER, A. L.; SGARBOSSA, J., & PERIPOLLI, M. Plastocrono, fenologia e produção de ervilha verde em diferentes épocas de cultivo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 47, p. e008222, 2023.

LAM, A. C. Y.; CAN KARACA, A.; TYLER, R. T.; & NICKERSON, M. T. Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. **Food reviews international**, v. 34, n. 2, p. 126-147, 2018.

LAZZI, C. MELI, F., LAMBERTINI, F., BOTTESINI, C., NIKOLAEV, I., GATTI, M. et al. Growth promotion of Bifidobacterium and Lactobacillus species by proteinaceous hydrolysates derived from poultry processing leftovers. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 341–349, fev. 2013.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LI, W.-H., LI, H., ZHANG, Y.-X., HE, L.-J., ZHANG, C., & LIU, X. Different effects of soybean protein and its derived peptides on the growth and metabolism of Bifidobacterium animalis subsp. animalis JCM 1190. **Food Function**, v. 12, p. 5731- 5744, 2021.

LI, J.; CHEN, Y.; WANG, D.; YIN, L.; LV, C., ZANG; J., ... & ZHANG, T. Ozone treatment increase the whiteness of soy protein isolate through the degradation of isoflavone. **Food Chemistry**, v. 464, p. 141665, 2025.

LIEPKE, C.; ADERMANN, K.; RAIDA, M.; MÄGERT, H. J.; FORSSMANN, W. G.; & ZUCHT, H. D. et al. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 712–718, 2002.

LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins). **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.27, p.291-319, 1976.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. “Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms,” **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LIU, G. CHU, M., XU, P., NIE, S.-Y., XU, X., & REN, J.-Y. . Effects of *Ilisha elongata* proteins on proliferation and adhesion of *Lactobacillus plantarum*. **Food Chemistry: X**, v. 13, 30 mar. 2022.

LIU, K. Cellular biological and physico chemical basics for hard-to-cook defectin legumes seeds. *CRC. Crit. Rev. Food Science Nutrition.*, v, 35, p. 263, 1995.

MARIOTTI, F. Plant Protein, Animal Protein, and Protein Quality, In: MARIOTTI, F. Vegetarian and Plant based Diets in Health and Disease Prevention. **Academic Press**, p. 621-642, 2017.

MATHAI, J. K., LIU, Y., & STEIN, H. H. Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). **British Journal of Nutrition**, 117, 490 – 499, fev. 2017.

MELI, F., LAZZI, C., NEVIANI, E., GATTI, M. Effect of protein hydrolyzates on growth kinetics and aminopeptidase activities of some Bifidobacterium species. **Anaerobe**, v. 22, p. 130–133, ago. 2013.

MELI, F., LAZZI, C., NEVIANI, E., GATTI, M. Effect of protein hydrolysates on growth kinetics and aminopeptidase activities of Lactobacillus. **Curr. Microbiol**, v. 68, p. 82–87, jan. 2014.

MENARD, O.; LESMES, U.; SHANI, L.C.S.; ARAIZA CALAHORRA, A.; LAVOISIER, A.; MORZEL, M.; RIEDER, A.; FERON, G.; NEBBIA, S.; MASHIAH, L.; ANDRES, A.; BORNHORST, G.; CARRIÈRE, F.; EGGER, L.; GWALA, S.; HEREDIA, A.; KIRKHUS, B.; MACIERZANKA, A.; PORTMAN, R.; RECIO, I.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; TOURNIER, .; SARKAR, A.; BRODKORB, A.; MACKIE, A.; DUPONT, D. Static in vitro digestion model adapted to the general older adult population: an INFOGEST international consensus. **Food & Function**, v. 14, n. 10, p. 4569-4582, 2023.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, TORSTEN, BOURLIEU, C.; ... & BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MUDGIL, P.; KILARI, B.P.; KAMAL, H.; OLALERE, O.A.; FITZGERALD, R.J.; GAN, C.Y.; & MAQSOOD, S. Multifunctional bioactive peptides derived from quinoa protein hydrolysates: Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase, dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I converting enzymes. **Journal of Cereal Science**, v. 96, 1 nov. 2020.

MOUGHAN, P. J., & STEVENS, B. R. Digestion and absorption of protein. In M. Stipanuk, & M. Caudill (Eds.), *Biochemical, physiological and molecular aspects of human nutrition* (pp. 162e178). St Louis, MO, USA: Elsevier, 2012.

NASRABADI, M. N.; DOOST, A. S.; MEZZENGA, R. Modification approaches of plantbased proteins to improve their techno-functionality and use in food products. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 118, p. 106789, 2021.

NEACSU, M., MCBEY, D., & JOHNSTONE, A. M. Meat reduction and plant-based food. In **Sustainable Protein Sources** (pp. 359–375). 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802778-3.00022-6>.

NEVES, V. A.; SILVA JR, S. I., & SILVA, M. A. D. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade in vivo e in vitro das proteínas do tremoço-doce (*Lupinus albus* L.), var. Multolupa. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 832-840, 2006.

NONGONIERMA, A. B., & FITZGERALD, R. J. Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 43, p. 239-252, out. 2017.

ODA, H.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; SATO, T.; XIAO, J. Z.; ABE, F.; & IWATSUKI, K. Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1843–1849, mar. 2013.

OLIVEIRA, E. C.; CARVALHO, J. D. A.; REZENDE, F. C.; & FREITAS, W. A. D. Viabilidade técnica e econômica da produção de ervilha (*Pisum sativum* L.) cultivada sob diferentes lâminas de irrigação. **Engenharia Agrícola**, v. 31, p. 324-333, 2011.

ONU. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World Population Prospects 2019: Highlights**. 2019.

OMOSEBI, M. O.; OSUNDAHUNSI, O. F.; FAGBEMI, T. N. Effect of extrusion on protein quality, antinutritional factors, and digestibility of complementary diet from quality protein maize and soybean protein concentrate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 4, 1 ago. 2018.

ONWEZEN, M. C. BOUWMAN, EP.; REINDERS, MJ.; DAGEVOS, H. A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. **Appetite Academic Press**, 1 abr. 2021.

PAIXÃO, L. A.; CASTRO, FFS. Colonization of the intestinal microbiota and its influence on health host. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 14, n. 1, p. 85-96, 2016.

PAN, M. et al. Advances on food-derived peptidic antioxidants—a review. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 799, 2020.

POCH, M. & BEZKOROVAINY, A. Bovine milk k-casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. **J. Agric. Food Chem.** 39, 73–77, 1991.

PYETT, S., DE VET, E.; TRINDADE, L. M.; VAN ZANTEN, H.; FRESCO, L. O. Chickpeas, crickets and chlorella: our future proteins. **Wageningen University & Research**, p 36. 2019.

ROBERFROID, M.B. “Unilin-type fructans: functional food ingredients” **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2493S-2502S, 2007.

SÁ, A. G. A., MORENO, Y. M. F., & CARCIOFI, B. A. M. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 170–184, mar. 2020.

SAMTIYA, M.; ALUKO, R.E.; DHEWA, T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. **Food Production Processing and Nutrition**, v. 2, p. 6, 2020.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Probióticos e Prebióticos em Alimentos: **Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2011.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTISTA, J.; & MILLÁN, FJFC. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): Chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, 64(2), 237–243, 1999.

SANDERS, M.E. “Probiotics: considerations for human health”. **Nutrition Reviews**, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

- SANTOS-HERNÁNDEZ, M.; ALFIERI, F.; GALLO, V.; MIRALLES, B.; MASI, P.; ROMANO, A.; ... & RECIO, I. Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol. **Food Research International**, v, 137, p. 109708, nov. 2020.
- SAARELA, M.; LÄHTEENMÄKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; & MATTILA-SANDHOLM, T. Gut bacteria and health foods – the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 99-117, 2002.
- SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. D. S.; CARVALHO, A. F. D.; GAUCHERON, F. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 2018185, 2019.
- SGARBIERI, V. C. Impact of Bovine Milk Whey Proteins and Peptides on Gastrointestinal, Immune, and Other Systems. **Dairy in Human Health and Disease across the Lifespan**. Elsevier Inc., p.31-35, 2017.
- SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Bioactive peptides. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 914-931, 2008.
- SMYTH, E.; CLEGG, R. A.; HOLT, C. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 121-126, 2004.
- THAKUR, A.; PANESAR, P.S.; SAINI, M.S. L(+)-Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* using low cost agro-industrial waste as carbon and nitrogen sources. **Waste Biomass Valor**. v. 10, p. 1119–1129, 2019.
- TIPTON, K. D.; ELLIOTT, T. A.; CREE, M. G.; AARSLAND, A. A.; SANFORD, A. P.; & WOLFE, R. R. Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 2007.
- TROSZYNSKA, A.; CISKA, E. Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, n. 1, p. 15-22, 2002.
- TULBEK, M. C.; LAM, R. S. H.; ASAVAJARU, P.; & LAM, A. Pea: A sustainable vegetable protein crop. **In Sustainable Protein Sources**. Elsevier Inc., p. 145–164, 2017.

VAN VLIET, S., BURD, N. A., & VAN LOON, L. J. The skeletal muscle anabolic response to plant- versus animal-based protein consumption. **The Journal of Nutrition**, v.145, p. 1981–1991, 2015.

VERGIN, F. “Anti-und Probiotica,” **Hipokrates**, vol. 25, pp. 116–119, 1954.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International dairy journal**, v. 9, n. 8, p. 497-505, 1999.

WALSTRA, P.; WOULTER, J.T.M; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 739, 2006.

WANG, Y. “Prebiotics: present and future in food science and technology”. **Food Research International**, v.42, p. 8-12, 2009.

WEINDL, I.; OST, M.; WIEDMER, P.; SCHREINER, M.; NEUGART, S.; KLOPSCH, R.,;... & KLAUS, S. Sustainable food protein supply reconciling human and ecosystem health: A Leibniz Position. **Global Food Security**, v. 25, 1 jun. 2020.

WOLFE, R. R.; BAUM, J. I.; STARCK, C.; & MOUGHAN, P. J. Factors contributing to the selection of dietary protein food sources. **Clinical Nutrition**, v.37, n. 1, p. 130-138, fev. 2018.

YU, Y. J.; AMORIM, M.; MARQUES, C.; CALHAU, C.; & PINTADO, M. Effects of whey peptide extract on the growth of probiotics and gut microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 507-516, 2016.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J., Amsterdam**, v.8, p.473-479, 1998.

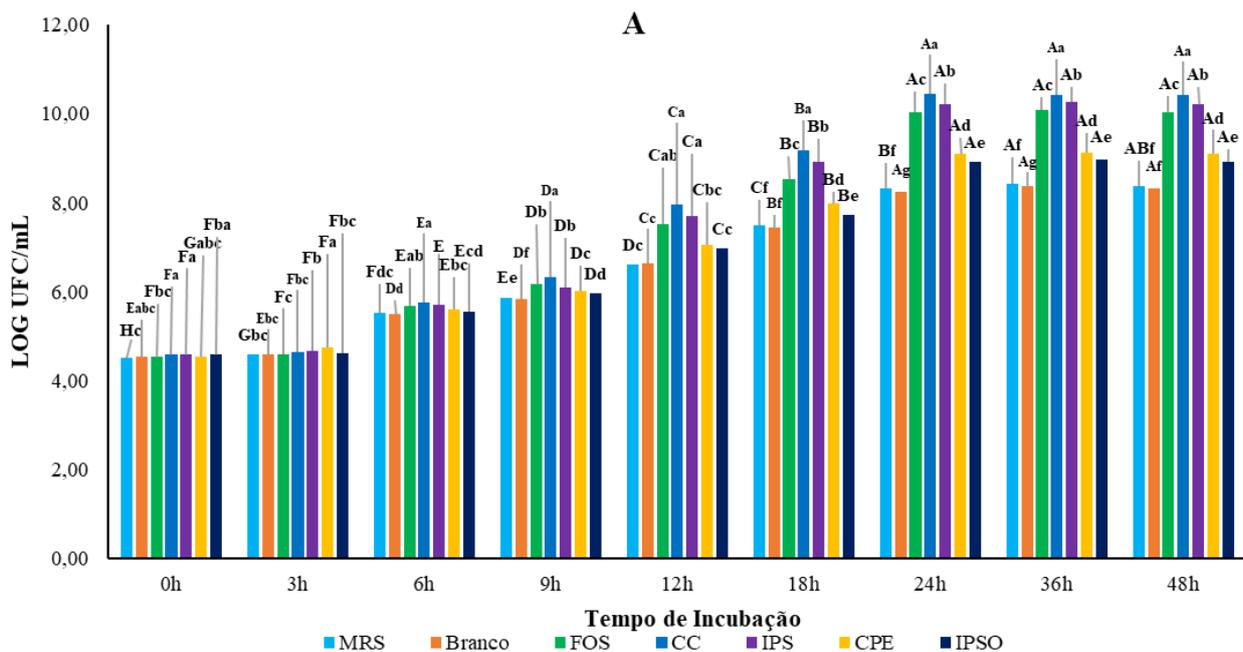
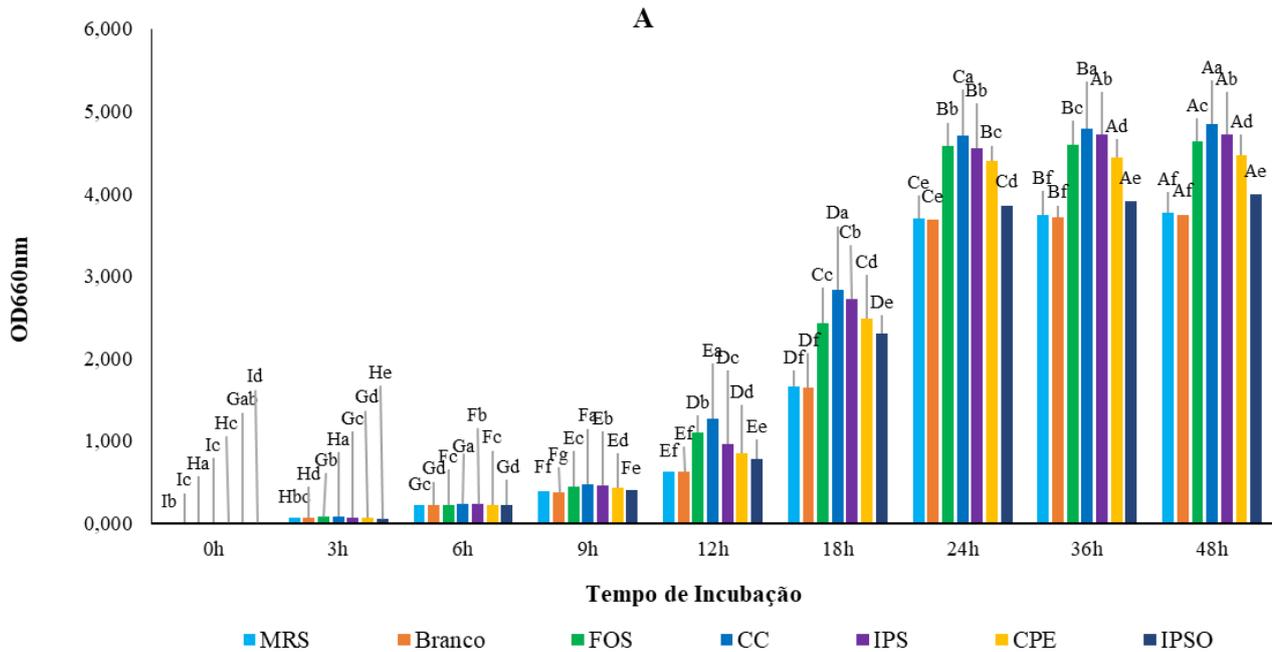
ZHAO, Q.-Y.; Fu, Y.-X.; Zhang, F.; Wang, C.; Yang, X.-H.; Bai, S.-Q., et al. Heat-treated adzuki bean protein hydrolysates reduce obesity in mice fed a high-fat diet via remodeling gut microbiota and improving metabolic function. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 66, n. 8, p. 2100907, 2022.

ZHANG, G.-S., WANG, X., HAN, B., LV, Y.-X., LI, D.-H., & LIU, J. Effect of metallothionein egg hydrolysates on the growth of two lactic acid bacteria *in vitro*. **Science and Technology of Food Industry**, v.4, p. 99–132, 2020.

ZHANG, C.; XIA, S.-Q.; ZHANG, Y.-X.; ZHU, S.-Y.; LI, H.; & LIU, X.-Q. Identification and characterization of soybean peptides and their fractions used by *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lra05. *Food Chemistry*, v. 401, p. 134195, 2023.

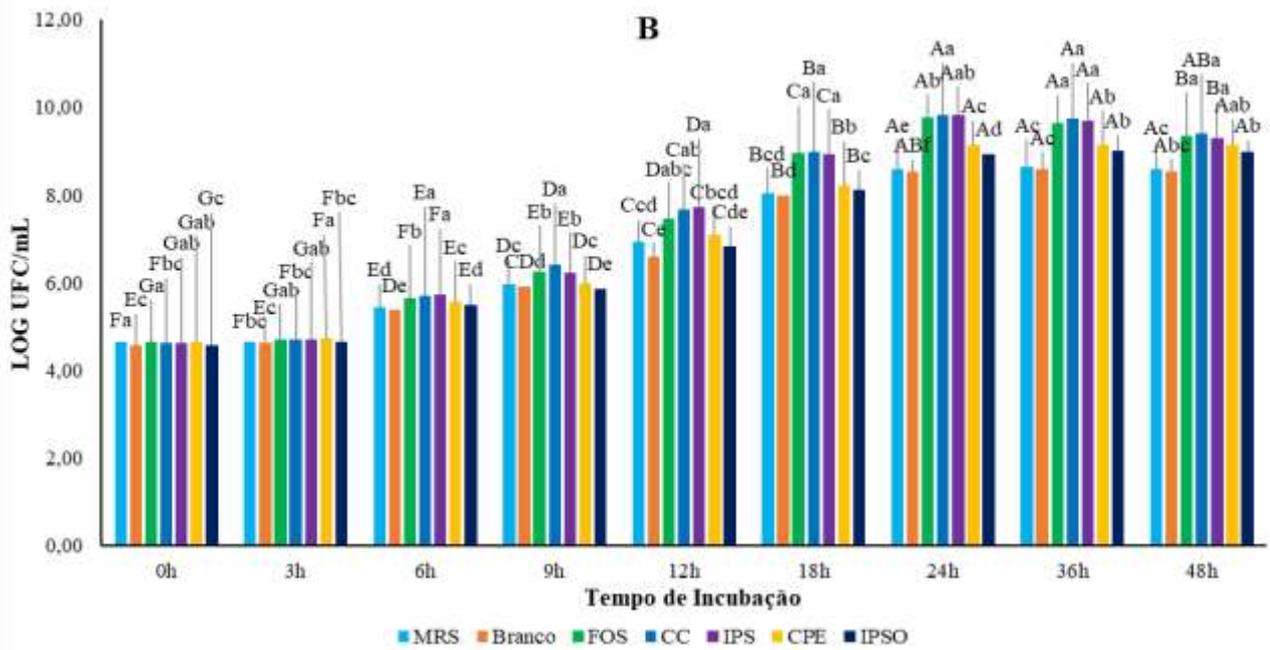
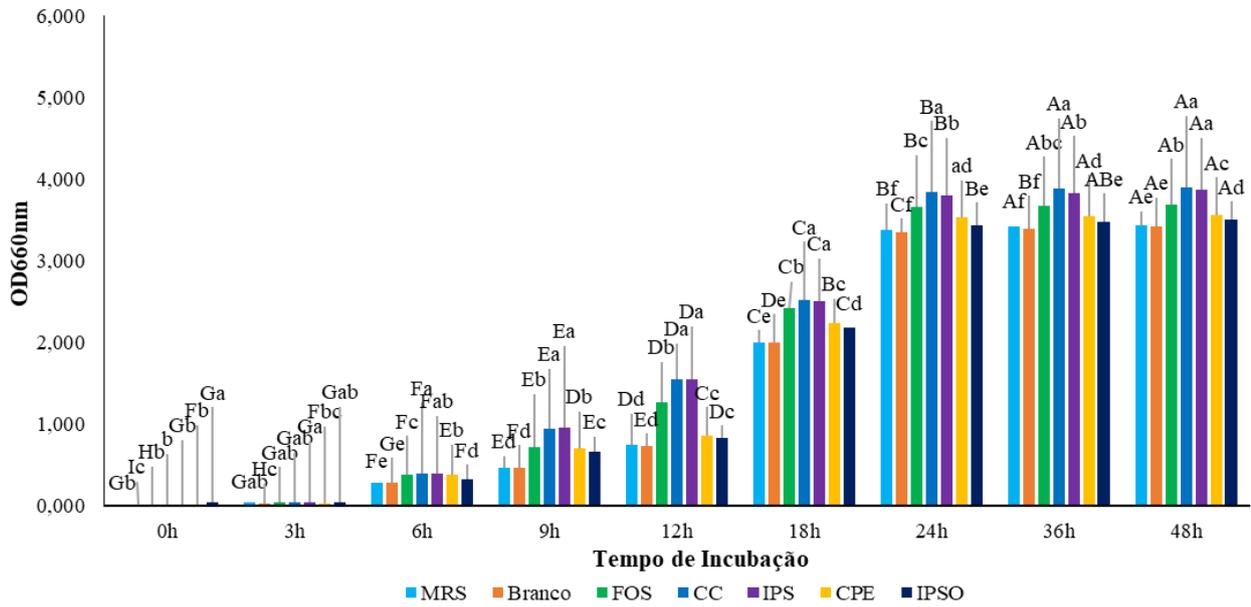
## Anexo I

Os gráficos completos do efeito da interação entre os tratamentos e o tempo de avaliados através da densidade ótica (DO) e a contagem de UFC/mL de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (A), *Lactocaseibacillus casei* (B), *Lactocaseibacillus rhamnosus* (C) e *Lactobacillus helveticus* (D) são apresentados a seguir:

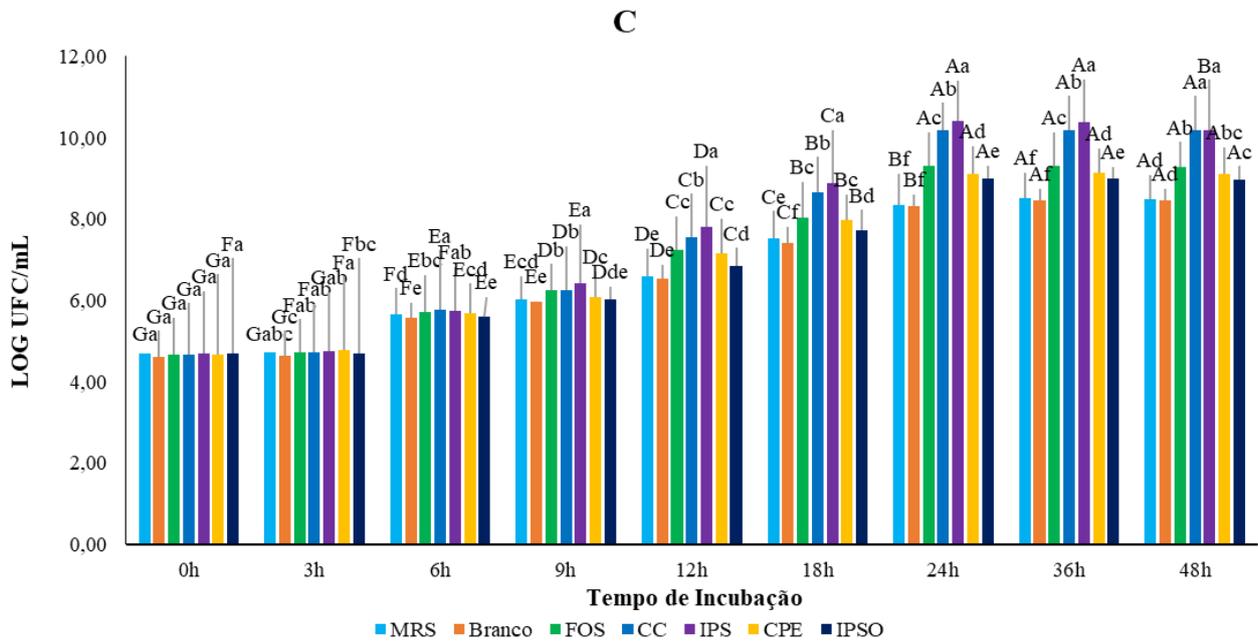
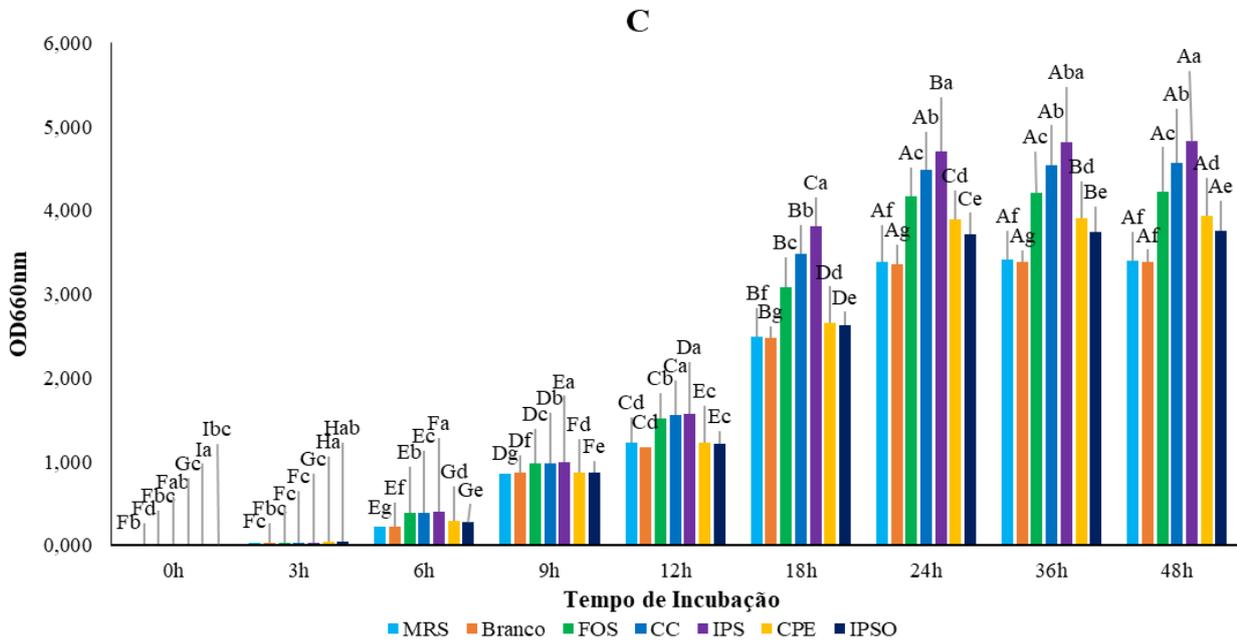


Letras minúsculas indicam diferença significativa a 5% entre os tratamentos para o mesmo período.  
Letras maiúsculas indicam diferença significativa a 5% entre períodos para o mesmo tratamento

## B

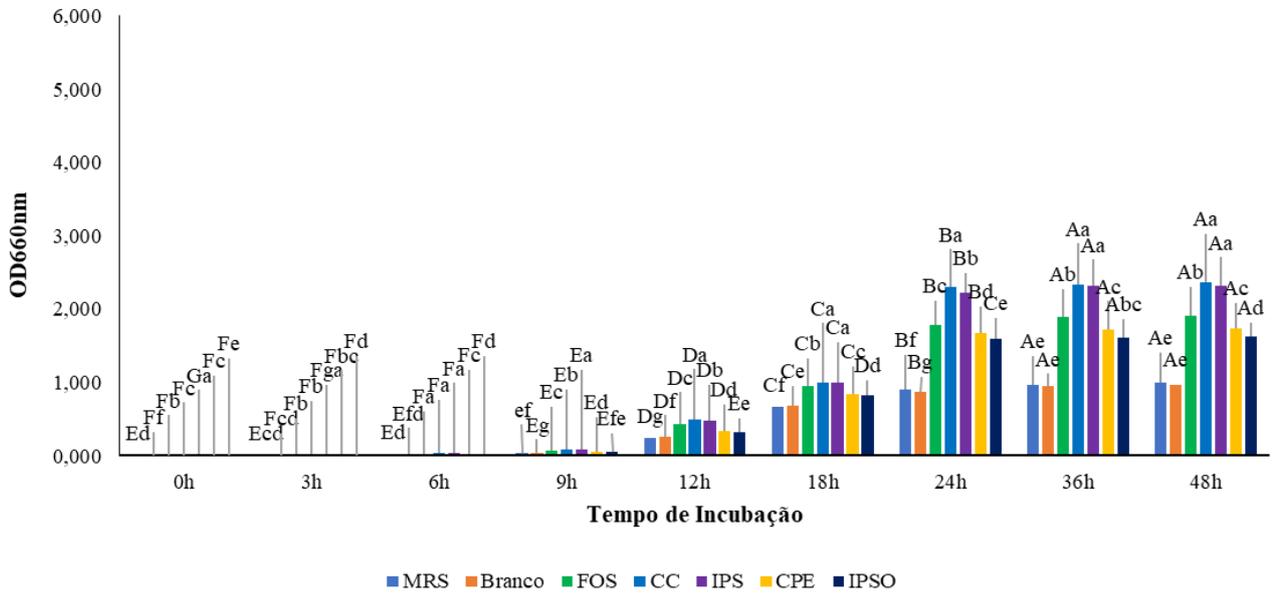


Letras minúsculas indicam diferença significativa a 5% entre os tratamentos para o mesmo período.  
Letras maiúsculas indicam diferença significativa a 5% entre períodos para o mesmo tratamento

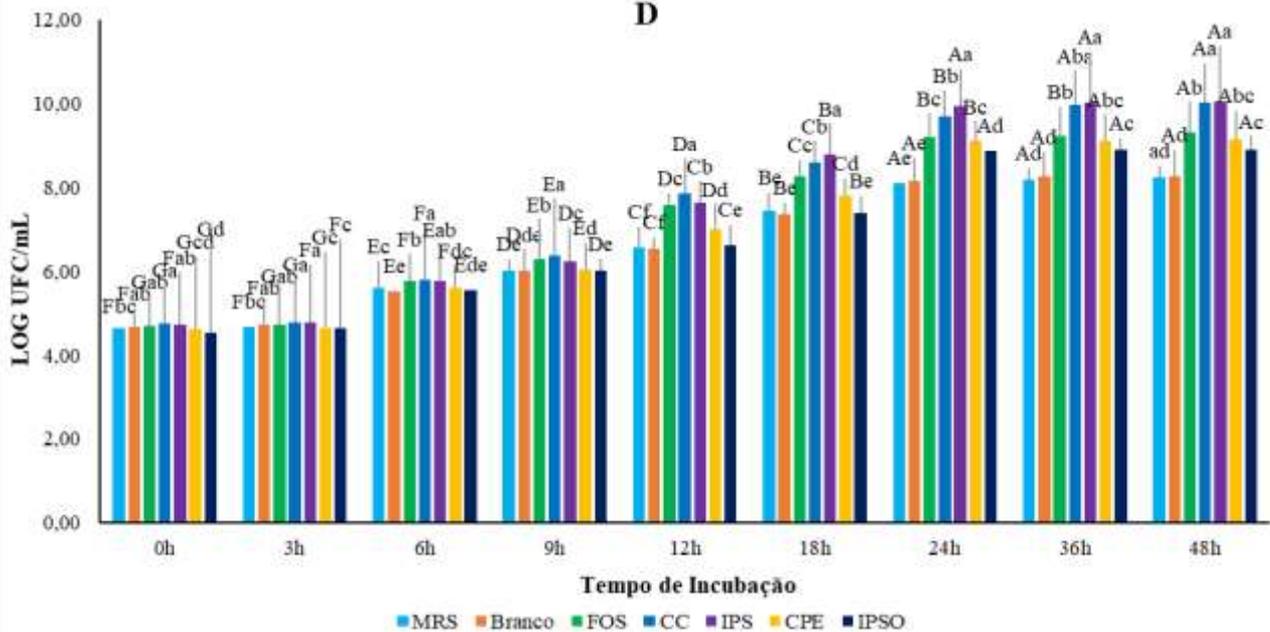


Letras minúsculas indicam diferença significativa a 5% entre os tratamentos para o mesmo período.  
 Letras maiúsculas indicam diferença significativa a 5% entre períodos para o mesmo tratamento

## D



## D



Letras minúsculas indicam diferença significativa a 5% entre os tratamentos para o mesmo período.  
Letras maiúsculas indicam diferença significativa a 5% entre períodos para o mesmo tratamento