



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO**

**ADALGISA GABRIELA DOS SANTOS GUIMARÃES  
ANA BEATRIZ PRAIA RIBEIRO**

**PROPOSTA DE BEBIDA PROBIÓTICA A BASE DE ÁGUA DE COCO**

**BELÉM – PA  
2018**

ADALGISA GABRIELA DOS SANTOS GUIMARÃES  
ANA BEATRIZ PRAIA RIBEIRO

## **PROPOSTA DE BEBIDA PROBIÓTICA A BASE DE ÁGUA DE COCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira  
Co-orientador: MSc. Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior.

BELÉM – PA  
2018

ADALGISA GABRIELA DOS SANTOS GUIMARÃES  
ANA BEATRIZ PRAIA RIBEIRO

**PROPOSTA DE BEBIDA PROBIÓTICA A BASE DE ÁGUA DE COCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Conceito:

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira**  
(FEA/ITEC/UFPA – Orientador)

---

**MSc. Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior**  
(ITEC/UFPA – Co-orientador)

---

**Prof<sup>a</sup>. MSc. Yamila Fernandes Mota Alves**  
(FANUT/ICS/UFPA – Membro interno)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Santos Lopes**  
(FEA/ITEC/UFPA – Membro externo)

---

**Dr<sup>a</sup>. Márcia Gleice Souza**  
(ICEN/UFPA – Suplente)

Aos nossos pais que com apoio constante, sempre nos permitiram ir além e em busca dos nossos objetivos e sonhos.

Ana Beatriz Praia e  
Adalgisa Guimarães.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Welligton Gatinho Ribeiro e Walnize Lima Praia pelo apoio incondicional e incentivo para dar o meu melhor sempre. Pelo exemplo de companheirismo e amor e por me ensinar que o melhor caminho que podemos seguir é o da educação.

Ao meu irmão, Júnior, aos meus avós, familiares e amigos agradeço por torcerem por mim e estarem ao meu lado sempre que precisei, seja para acolher, escutar, conversar ou descontrair. Vocês foram fundamentais nessa caminhada.

Agradeço imensamente ao meu orientador Nelson Rosa Ferreira por ter nos acolhido e acreditado em nós quando achávamos que não ia ser possível. Obrigada por todo o incentivo, pelas orientações e ensinamentos, pela paciência e por nos permitir a realização deste trabalho com êxito.

Agradeço ao meu co-orientador Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior, por toda a paciência e por todo os ensinamentos durante os dias e noites de trabalho nos laboratórios. Muito obrigada, aprendi muito com você e com certeza é um profissional o qual irei sempre me espelhar.

Gostaria de agradecer também aos professores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Santos Lopes e o Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo que gentilmente permitiram o uso do espaço e do material dos laboratórios de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC) e de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará. Sem o apoio de vocês, este trabalho não seria possível.

Agradeço aos meus colegas de Curso e de estágio, em especial a Aline da Silva Cota e o Luiz Felipe Cruz, pelos momentos compartilhados no decorrer do Curso, aprendemos e crescemos juntos, o que tornou essa longa caminhada mais prazerosa. Desejo a vocês todo o sucesso profissional e pessoal que vocês almejam.

Por fim, gostaria de agradecer imensamente à minha companheira de graduação e de Trabalho de Conclusão de Curso, Adalgisa Guimarães. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pela sintonia, pela paciência e por acreditar nesse trabalho junto comigo. Só nós duas sabemos o quanto foi difícil chegar até aqui, e sim, nós conseguimos.

Muito obrigada!  
Ana Beatriz Praia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Lucila Pinto dos Santos, e meu pai, Antônio Evandro Cavalcante Guimarães, por todo amor e apoio dado, pelo empenho e dedicação em me proporcionar uma educação de qualidade, incentivo para que eu trilhasse o melhor caminho, e respeito às minhas escolhas. Vocês são meus maiores exemplos.

Ao meu padrasto, Ataíde Rabelo Júnior e minha madrasta, Renata Cristina Souza, que me acompanham desde a infância e sempre torceram para o sucesso de minhas realizações. Aos meus irmãos, Gabriel, Arthur, Murilo, Mateus e Daniel, familiares e amigos que são partes fundamentais da minha vida.

Ao meu namorado, Brendo Silva Gaia Farias, por ser um ótimo companheiro e ter contribuído, direta e indiretamente, no processo de produção do presente trabalho, sendo atencioso e prestativo, nesta importante etapa da minha vida. Obrigada por tornar tudo mais simples.

Manifesto meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Nelson Rosa Ferreira, por todos os ensinamentos passados, toda compreensão e positividade frente aos obstáculos, e nos mostrar que sempre há outras alternativas a seguir. E ao meu co-orientador Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior, a quem admiro pelo profissional dedicado que é, e sou enormemente grata pela ajuda excepcional, conselhos e atenção dada à nós neste período. Obrigada por tudo. Agradeço à ambos pelo acolhimento, paciência, e por tornarem possível a realização deste trabalho.

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Santos Lopes e ao Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo, por permitirem nosso acesso aos laboratórios de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC) e de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará. Obrigada por esta contribuição essencial.

Aos professores que tive durante a graduação e aos meus colegas de Curso e de estágio, em especial Luiz Felipe Cruz, Aline Cota, Débora Pereira e Gredany Palheta, com quem compartilhei a experiência da graduação. Desejo todo sucesso.

Sou grata também à minha dupla de TCC, de graduação, e de sonhos, Ana Beatriz Praia. Agradeço a amizade e companheirismo, todo esforço, apoio e incentivo a seguir em frente e buscar planos maiores. Esse é só o começo, e temos pela frente grandes carreiras profissionais a trilhar.

Muito obrigada!

Adalgisa Gabriela dos Santos Guimarães.

*“Digo aos moços que a verdadeira ciência não é a que se incrusta para ornato, mas a que se assimila para nutrição”*

Machado de Assis.

## RESUMO

Os alimentos funcionais são capazes de gerar efeitos benéficos, metabólicos e ou fisiológicos aos seus consumidores, neste contexto, os probióticos são bastante requisitados por seu papel promotor da saúde, sendo as principais fontes de obtenção os alimentos fermentados, como leites fermentados e iogurte. As bactérias ácido-láticas, são os microorganismos mais utilizados na produção de alimentos probióticos, devido às suas características funcionais comprovadas e por serem consideradas de ingestão segura. Como alternativa de uso para indivíduos que por algum motivo não consomem derivados lácteos, este trabalho objetivou propor a formulação de uma bebida com características probióticas a base de água de coco, isenta de lactose e fermentada por *Lactobacillus casei* shirota. Realizou-se duas formulações: uma com água de coco industrializada (F1) e outra com a água de coco in natura (F2), com correção do pH de ambas. Após o inóculo de 3% (v/v) de bebida fermentada comercializada, que contém bactérias ácido-láticas, as formulações foram mantidas em fermentação por 48 h em 36 °C. As formulações F1 e F2 foram analisadas quanto a presença de coliformes termotolerantes (45 °C), e em intervalos de 6 horas durante o período de fermentação houve a avaliação da estabilidade físico-química (pH e acidez total titulável), e determinação do perfil de crescimento microbiano. As águas de coco utilizadas apresentaram-se em condições sanitárias satisfatórias, de acordo com a legislação vigente. Na formulação F1 obteve-se crescimento celular ideal em 24 h de fermentação, com faixa de pH e acidez praticamente constante. Já em F2 foram necessárias 12 h para obter o crescimento esperado ( $10^8$ - $10^9$  UFC/mL), e notou-se valores crescentes de acidez no decorrer das 48 hs de análise, com conseqüente diminuição do pH. Os resultados obtidos foram satisfatórios e demonstram um potencial para produção de bebida probiótica com substrato de água de coco. É necessário, ainda, outras análises para determinação de lactose e para a construção do perfil nutricional do produto final, além de uma análise mais efetiva quanto ao tempo de prateleira e armazenamento do produto proposto.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*. Fermentação. Água de Coco. Alimentos Funcionais. Probióticos.

## ABSTRACT

Functional foods can generate metabolic and or physiological beneficial effects to their consumers, in this context, probiotics are highly requested for their role as health promoters, being fermented foods the main sources, such as fermented milks and yogurt. The acid-lactic bacteria are the most commonly used microorganisms in the development of probiotic foods, due their proven functional characteristics and their generally recognized as safe ingestion. As an alternative to consumption of individuals who for some reason do not eat dairy products, this study aimed to propose a formulation of a beverage with probiotic characteristics based on coconut water, lactose free and fermented by *Lactobacillus casei* shirota. Two formulations were made: one with industrialized coconut water (F1) and the other with *in nature* coconut water (F2), the pH of both was adjusted. After the inoculation of 3% (v/v) of commercialized fermented beverage, which contains acid-lactic bacteria, the formulations were kept to fermentation for 48 h at 36 °C. The formulations F1 and F2 were evaluate the presence of thermotolerant coliforms (45 °C), and at intervals of 6 hour during the fermentation period the physical-chemical stability (pH and total acidity) was evaluated and the determination of microbial growth profile. The coconut water used in this experiment were presented in satisfactory sanitary conditions, according to the current legislation. The F1 formulation obtained ideal cell growth in 24 hours of fermentation, with pH and acidity range practically constant. In F2, it was necessary 12 hours to obtain the expected growth ( $10^8$ - $10^9$  CFU/mL), and it was noticed an increase in the acidity value during the 48 hours of analysis, along with a consequent decrease in pH. The results obtained were satisfactory and showed a potential for probiotic beverage production with the coconut water substrate. Further analysis is required for the determination of lactose and for construction of a nutritional profile of the final product, as well as a more effective analysis of the shelf life and storage of the proposed product.

**Keywords:** *Lactobacillus*. Fermentation. Coconut Water. Functional Foods. Probiotics.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Etapas de processamento da água de coco .....	28
<b>Tabela 2</b> – Características das principais formas de água de coco Comercializada .....	28
<b>Tabela 3</b> – Contagem de células nas formulações em duplicata em UFC/mL por tempo de incubação na diluição $10^{-6} \pm dp$ .....	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Aspecto microscópico dos <i>Lactobacillus casei</i> .....	19
<b>Figura 2</b> – Vias de produção da fermentação homolática e heterolática .....	23
<b>Figura 3</b> – Bebida probiótica a base de água de coco industrializada .....	36
<b>Figura 4</b> – Aspecto colonial dos <i>Lactobacillus casei</i> shirota da bebida formulada em meio ágar MRS .....	37
<b>Figura 5</b> – Gráfico de variação do pH durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco industrializada (F1) .....	39
<b>Figura 6</b> – Gráfico de variação de acidez durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco industrializada (F1) .....	39
<b>Figura 7</b> – Gráfico de variação do pH durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco <i>in natura</i> (F2) .....	40
<b>Figura 8</b> - Gráfico de variação de acidez durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco <i>in natura</i> (F2) .....	40
<b>Figura 9</b> – Fluxograma de formulação da bebida probiótica a base de água de coco <i>in natura</i> (F2) .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**APHA** - American Public Health Association

**BAL** – Bactérias ácido-láticas

**BPF** - Boas Práticas de Fabricação

**GALT** - Gut Associated Lymphoid Tissues

**GRAS** - Generally Recognized As Safe

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IL** - Intolerância à Lactose

**LCT** - Gene codificador da Lactase

**MRS** - Man Rogosa Shape

**NMP** – Número Mais Provável

**PPD** – Enzimas Peroxidases

**PPO** – Enzimas Polifenoloxidasas

**SBIS** – Sociedade Brasileira de Informática em Saúde

**TGI** – Trato Gastrointestinal

**UFC** – Unidades Formadoras de Colônias

**UHT** - Ultra High Temperature

**VCAM-1** - Vascular Cell Adhesion Molecule 1

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	X
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1 PROBIÓTICOS .....	16
3.1.1 Microbiota Intestinal .....	16
3.1.2 Mecanismo de Ação dos Probióticos .....	18
3.1.3 <i>Lactobacillus casei</i> .....	19
3.1.4 Administração de <i>L. casei</i> em Alimentos .....	20
3.2 FERMENTAÇÃO LÁTICA .....	20
3.2.1 Bactérias Ácido-Láticas (BAL) .....	22
3.2.2 Fabricação de Produtos Fermentados .....	23
3.3 ÁGUA DE COCO .....	25
3.3.1 Composição e Propriedades Físico-Químicas da Água de Coco .....	26
3.3.2 Produção de Coco Verde .....	26
3.3.3 Processamento da Água de Coco .....	27
3.4 LACTOSE .....	31
3.5 INTOLERÂNCIA À LACTOSE (IL) .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 MATERIAL PROBIÓTICO E ÁGUA DE COCO .....	34
4.2 MÉTODOS .....	34
4.2.1 Análises nas Águas de Coco .....	35
4.2.2 Elaboração da Bebida Probiótica .....	35
4.2.3 Avaliação da Bebida Probiótica .....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
5.1 CRESCIMENTO BACTERIANO .....	36

5.2 ANÁLISE DE COLIFORMES .....	38
5.3 ANÁLISE DE PH E ACIDEZ .....	38
5.4 ÁGUA DE COCO INDUSTRIALIZADA E ÁGUA DE COCO <i>IN NATURA</i> .....	41
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas-degenerativas têm sido a principal causa de morte no Brasil e controlar os fatores de risco destas doenças é uma forma de aumentar a expectativa de vida com qualidade. Aspectos como a prática de atividades físicas e dieta equilibrada são essenciais para o tratamento e prevenção de tais doenças, colaborando para a manutenção da saúde (BORGES, 2017). Neste contexto, há um aumento no interesse por alimentos funcionais, com o propósito de obter os efeitos benéficos, metabólicos e fisiológicos que estes podem ocasionar (MARKOWIAK et al., 2017).

Os probióticos são bactérias gram-positivas, definidas internacionalmente como “microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, sendo classificados como alimentos funcionais (FAO/WHO, 2001).

Entre os principais gêneros de probióticos estão os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os lactobacilos são pertencentes do grupo de bactérias ácido-láticas (BAL), e residem naturalmente no trato gastrointestinal, cavidade oral e vagina. As bifidobactérias representam até 90% de bactérias anaeróbias em lactentes, sendo importantes ao bom funcionamento do organismo humano durante toda a vida (CARDOSO, FLORENCE, 2015).

Os probióticos atuam para a manutenção da função intestinal saudável na prevenção e tratamento de diarreias e alergias alimentares, alívio da intolerância à lactose e normalização do trânsito intestinal (SANDERS et al., 2014); diminuição do colesterol sérico, redução dos níveis plasmáticos de LDL e homeostase da glicose; e na função imune, regulando o sistema de defesa (FLESCH et al., 2014; SANDERS et al., 2014; MARKOWIAK et al., 2017).

As alergias e intolerâncias quanto a ingestão do leite são as principais causas para a restrição ao consumo de laticínios. De maneira geral, as alergias e intolerâncias se manifestam por meio da incapacidade bioquímica do organismo de digerir, absorver ou metabolizar um componente específico. A intolerância à lactose é caracterizada pela incapacidade de digerir a lactose devido à falta ou diminuição da enzima lactase (RANGEL et al., 2016).

Tendo em vista que a forma mais comum de acesso aos probióticos é por meio dos leites fermentados e iogurtes, pessoas que apresentam intolerância à lactose não podem consumir este tipo de alimento e usufruir de seus benefícios. É previsto que cerca de 75% da população, ao chegar à fase adulta, desenvolva esse tipo de intolerância, pela perda da capacidade de digerir a lactose (CUTRIM et al., 2017).

No Brasil, os alimentos à base de laticínios estão entre os principais segmentos da indústria alimentícia, ocupando a posição de quarto lugar com um rendimento de cerca de R\$ 59 bilhões no ano de 2015. Além disso, fazem parte dos principais ingredientes definidos como tendência do mercado, com destaque aos probióticos, produtos isentos de lactose e alimentos fermentados (BARRETTO et al., 2016).

A água de coco, obtida da parte líquida do fruto do coqueiro, é pouco calórica, possui sabor adocicado e sua composição confere benefícios, tais como reposição de eletrólitos, como sais minerais, vitaminas, aminoácidos e glicídios. Atua como um excelente isotônico natural e dentre as propriedades funcionais atribuídas a água de coco, a reidratação e reposição de eletrólitos se apresentam como as principais (CARVALHO et al., 2006; DIAS et al., 2015; GOMES et al., 2015).

Como forma alternativa e econômica de produzir uma bebida fermentada, neste trabalho optou-se pelo desenvolvimento de uma bebida à base de água de coco, *in natura* e industrializada, adicionada de bactérias ácido lácticas provenientes de um leite fermentado comercializado. Todas matérias-primas são de fácil acesso, acessíveis economicamente e seguras do ponto de vista microbiológico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Propor a formulação de uma bebida com características probióticas a base de água de coco, isenta de lactose e fermentada por *Lactobacillus casei shirota*, a qual possa ser consumida de forma segura por indivíduos portadores de intolerância à lactose.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir bebida probiótica com matérias-primas (substrato e inóculo) de baixo custo e fácil obtenção;
- Avaliar se a bebida formulada apresenta as características probióticas previstas na legislação;
- Determinar o tempo de viabilidade de bactérias e temperatura de incubação;
- Avaliar as alterações do valor de pH e acidez durante a fermentação;
- Relacionar a bebida probiótica a base de água de coco industrializada e a bebida probiótica à base de água de coco *in natura*;
- Avaliar a qualidade sanitária da água de coco por meio da análise de coliformes totais;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PROBIÓTICOS

A nutrição possui um importante papel, além de sua função básica de fornecer os nutrientes necessários para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do organismo. Nutrir-se de forma saudável é um meio promissor de evitar doenças crônicas como obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Neste contexto, há um aumento no interesse por alimentos funcionais, com o propósito de obter os efeitos benéficos, metabólicos e ou fisiológicos que estes podem ocasionar (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Os probióticos são considerados microorganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo, sendo os probióticos aprovados pela Anvisa para alimentos os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade rhamnosus, *Lactobacillus casei* variedade defensis, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2002).

As bactérias do tipo probióticas mais utilizadas na produção de alimentos funcionais são as gram-positivas do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, devido ao fato destas serem conhecidos a bastante tempo e por fazerem parte da microflora intestinal humana, além de serem reconhecidamente seguras (TRIPATHI; GIRI, 2014).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são consideradas mais resistentes que as do tipo *Bifidobacterium*, visto que podem ser encontradas em alimentos de baixo pH (TRIPATHI; GIRI, 2014). Os *Lactobacillus* são pertencentes do grupo de bactérias ácido-láticas, e residem naturalmente no trato gastrointestinal, cavidade oral e vagina. As bifidobactérias são da classe de Actinobacteria e representam até 90% de bactérias anaeróbias em lactentes, sendo importantes ao bom funcionamento do organismo humano durante toda a vida (CARDOSO, FLORENCE, 2015).

##### 3.1.1 Microbiota Intestinal

O trato gastrointestinal é um ecossistema complexo, inclui o epitélio gastrointestinal, o sistema imune e a microbiota. A principal vantagem do consumo regular dos probióticos é a influência positiva sobre a microbiota intestinal em que habita, por promover o equilíbrio adequado para uma função normal do organismo (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

A microbiota intestinal é composta tanto por bactérias comensais ao organismo, quanto temporárias (de passagem pelo trato gastrointestinal). Estão situadas sobretudo no cólon, ambiente de anaerobiose e grande motricidade, contendo cerca de  $10^9$  a  $10^{13}$  bactérias por mililitro. A colonização microbiana é um processo dinâmico, dependente de fatores externos como a dieta, consumo de álcool, estresse, uso de laxante e antibióticos, além do modo de nascimento, genética e infecções (WEN; DUFFY, 2017).

A composição da microbiota desempenha um papel fundamental na condição metabólica do indivíduo, na regulação da homeostase energética (MIRAGHAJANI et al., 2017), e até mesmo na função cerebral, afetando o estado psicológico do hospedeiro (TAKADA et al., 2017).

A interação das bactérias benéficas da microbiota com o sistema imune humano provoca uma inibição de bactérias patogênicas (*Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, várias espécies de *Shigella*, *Staphylococcus* e *Yersinia*), gerando o estado saudável de eubiose. Este equilíbrio proporciona melhorias na digestão e absorção de nutrientes, síntese de vitaminas do complexo B e K e de ácidos graxos de cadeia curta, controle da permeabilidade intestinal e modulação eficiente da resposta inflamatória (QUILICI, 2017).

Por outro lado, a disbiose, desregulação da microbiota intestinal, está associada a vários estados de doença, como obesidade, diabetes (WEN; DUFFY, 2017), alergias, doenças inflamatórias intestinais, gastroenterites (SANDERS et al., 2014), e aumento da proliferação de patógenos, com possíveis infecções bacterianas (CARDOSO, FLORENCE, 2015).

Desta forma, manipular a microbiota intestinal a partir do uso de probióticos em conjunto com hábitos saudáveis, se mostra um meio para reduzir o risco global de diferentes doenças crônicas. Além disso, os probióticos atuam para a manutenção da função intestinal saudável na prevenção e tratamento de diarreias e alergias alimentares, alívio da intolerância à lactose e normalização do trânsito intestinal

(SANDERS et al., 2014); colaboram positivamente na função metabólica com a diminuição do colesterol sérico, redução dos níveis plasmáticos de LDL e homeostase da glicose; e na função imune, regulando o sistema de defesa, por aumentar a absorção de compostos vitamínicos e minerais e o estímulo à produção de ácidos orgânicos e aminoácidos (FLESCH et al., 2014; SANDERS et al., 2014; MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

### **3.1.2 Mecanismos de Ação dos Probióticos**

Pesquisadores concluíram que o efeito benéfico dos probióticos se deve tanto a interação dos microorganismos vivos ingeridos com o hospedeiro, quanto à ingestão dos metabólitos microbianos provenientes do processo fermentativo (TRIPATHI; GIRI, 2014). Alguns produtos do metabolismo dos probióticos apresentam propriedades anticancerígenas e imunossupressoras (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Dentre outros efeitos, há a redução dos riscos para o desenvolvimento de alguns tipos de tumores, devido a degradação de compostos com potencial carcinogênico, alterações qualitativas e/ou quantitativas envolvidas na produção de carcinógenos e a síntese de produtos antimutagênicos no cólon, como o butirato (FLESCH et al., 2014; CARDOSO, FLORENCE, 2015).

Os probióticos ajudam no reparo da candidíase, de cáries dentárias e de doenças gastrointestinais. Possuem alto potencial terapêutico no tratamento de doenças como obesidade, síndrome de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Os principais mecanismos de ação da funcionalidade probiótica são: antagonismo através da produção de substâncias antimicrobianas; competição com agentes patogênicos para adesão ao epitélio e para nutrientes; imunomodulação do hospedeiro; e inibição da produção de toxinas bacterianas (FAO/WHO, 2001).

A habilidade de agir contra patógenos torna os probióticos importantes na profilaxia e tratamento de infecções e na manutenção da homeostase da microbiota do hospedeiro. Eles atuam na defesa do intestino através da produção de metabólitos, como o peróxido de hidrogênio e ácidos acético e lático, responsáveis por reduzir o pH intestinal, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, além de produzir substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas. Outro meio para esta ação é através da co-agregação, que leva à formação de uma barreira protetora, impedindo

a colonização do epitélio por microorganismos indesejáveis (FAO/WHO, 2001; MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Sua adesão nas células epiteliais, além de bloquear os patógenos, pode desencadear uma cascata de sinalização, a partir do contato com o tecido linfoide (GALT- *gut associated lymphoid tissues*) que permite aos probióticos atuarem como moduladores dos efeitos locais e sistêmicos sobre a imunidade inata e adaptativa. O estímulo da resposta imune do hospedeiro ocorre também por conta do aumento da atividade fagocitária de neutrófilos, da citotoxicidade de células *natural-killer*, da síntese de Imunoglobulina A, da ativação de linfócitos T e B, e da redução de citocinas pró-inflamatórias (FLESCH et al., 2014; CARDOSO, FLORENCE, 2015).

### 3.1.3 *Lactobacillus casei*

A cepa de *Lactobacillus casei* é amplamente usada em alimentos, sendo algumas de suas aplicabilidades: prevenção da diarreia associada a uso de antibióticos em adultos e diarreia causada por *Clostridium difficile*; terapia adjuvante para erradicação de *H. pylori*; auxílio no crescimento do *Lactobacillus acidophilus*; melhora a digestão com redução da intolerância à lactose e constipação; e evitar disfunções abdominais e sintomas de gripe (FLESCH et al., 2014).



Figura 1 – Aspecto microscópico dos *Lactobacillus casei*.  
Fonte: Autores (2018).

Em estudo duplo-cego, randomizado, e controlado por grupo placebo, foi apresentado que o consumo regular de *Lactobacillus casei* é capaz de prover melhorias na qualidade do sono durante períodos de estresse elevado (TAKADA et al., 2017).

Outro estudo com grupo-controle demonstrou uma maior inibição no crescimento de *H. pylori* em pacientes com uso de probióticos. Em pacientes com Síndrome de resistência à insulina o consumo por 12 semanas mostrou uma redução significativa nos níveis de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), indicador de presença de citocinas inflamatórias (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Estudos experimentais demonstram a atuação dessa cepa na redução da inflamação, dos níveis de radicais livres e da destruição de células  $\beta$  em ilhotas de Langerhans (MIRAGHAJANI et al., 2017).

### 3.1.4 Administração de *L. casei* em Alimentos

Para aplicação em produtos alimentícios, os microorganismos probióticos escolhidos devem seguir critérios como: segurança, não havendo efeitos adversos para o consumidor; resistência para sobreviver à passagem no trato digestivo; capacidade de proliferação e aderência ao intestino; habilidade de competir com a microbiota residente, possuindo atividade antimicrobiana; ter benefícios clínicos devidamente comprovados; e atender a critérios tecnológicos, sendo passíveis de cultivo em larga escala, com estabilidade genética e viabilidade de manter a quantidade adequada de probióticos vivos até o momento do consumo. A forma como os probióticos atuam depende da cepa, dose e componentes usados para produzir o produto (FAO/WHO, 2001; MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

O *Lactobacillus casei* shirota é um probiótico reconhecido pela ANVISA e que assim como os demais microorganismos probióticos devem ter a quantidade mínima viável de microorganismo no produto final pronto para consumo na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para que possam promover a ação benéfica no organismo. É necessária comprovação da eficácia pela empresa, incluindo laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microorganismo até o prazo final de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (ANVISA, 2008).

## 3.2 FERMENTAÇÃO LÁTICA

A fermentação é utilizada pelo homem desde os tempos mais remotos. Os mecanismos pelo qual a fermentação atua começaram a ser estudados e esclarecidos

cerca de 150 anos atrás, porém a sua ação na conservação de alimentos já era bastante utilizada (DUNFORD, 2012).

Diversos produtos alimentícios têm sua produção proveniente da fermentação de microorganismos, tais como queijos, leite, vinho, cerveja, pães e outros. O processo de fermentação acontecia de forma natural, sendo assim, de acordo com a região, foi desenvolvida uma técnica própria para a produção de produtos fermentados, com diferentes formas de manuseio, condições e armazenamento, resultando em diferentes tipos de produtos com características sensoriais específicas, os quais foram passados de geração em diante. Com o passar do tempo, o processo de elaboração de produtos fermentados foi regularizado pela indústria (ORDÓÑEZ, 2005).

A fermentação tem como principais benefícios o aumento da segurança alimentar, o incremento do valor nutricional e das características sensoriais dos alimentos. Grande parte dos alimentos fermentados tem como microorganismos de ação as bactérias ácido-láticas, as quais são consideradas geralmente reconhecidas como seguras (GRAS - Generaly Recognized As Safe) e estão relacionadas aos probióticos (SOCCOL; PANDEY; LARROCHE, 2013; WU; HUANG; ZHOU, 2017).

Um dos produtos provenientes da fermentação mais consumidos é sem dúvida os leites fermentados, os quais tem como base as bactérias ácido-láticas. Devido a diversidade de BAL existentes, é possível obter diferentes tipos de leites fermentados, entretanto a produção deste tipo de produto consiste basicamente na pasteurização do leite, seguida pela sementeação e adição do microorganismo, os quais promovem a acidificação e o aparecimento de características sensoriais típicas da fermentação. Após esse processo é feita a refrigeração e o produto está pronto para a comercialização (ORDÓÑEZ, 2005).

O surgimento de pesquisas que comprovam os benefícios provenientes da ação de bactérias ácido láticas e probióticas na saúde e bem-estar tem despertado cada vez mais o interesse da indústria no desenvolvimento e aprimoramento de produtos alimentícios. É sabido que os probióticos tem ação fundamental no trato gastrointestinal, melhorando a flora intestinal, prevenindo contra diversas doenças e contribuindo para a saúde como um todo do indivíduo (SILVA et al., 2017).

Tendo em vista que a forma mais comum de acesso aos probióticos é por meio dos leites fermentados e iogurte, pessoas que apresentam intolerância à lactose ou

alergia à proteína do leite de vaca não podem consumir este tipo de alimento e usufruir de seus benefícios (CUTRIM et al., 2017).

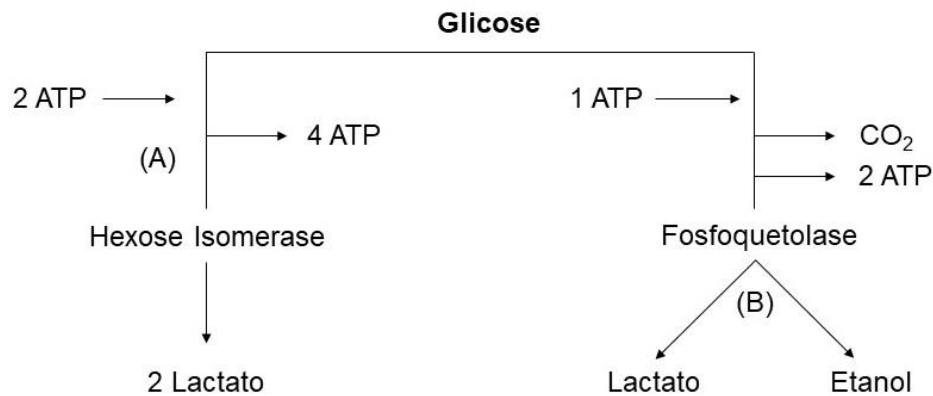
Em relação ao leite, o iogurte possui uma quantidade inferior de lactose, devido a fermentação das BAL, as quais convertem uma parte da lactose em ácido láctico. Ainda assim, há uma necessidade de alternativas que viabilizem o consumo de probióticos por meio de produtos isentos ou de baixa lactose (CUTRIM et al., 2017).

O Yakult é um leite fermentado produzido a base de leite desnatado e fermentado pelo probiótico *Lactobacillus casei* Shirota. O *L. casei* é uma bactéria gram-positiva, ácido láctica e heterofermentativa. Ademais, possui benefícios comprovados na saúde do trato gastrointestinal e ação antimutagênica (SOCCOL; PANDEY; LARROCHE, 2013).

### **3.2.1 Bactérias Ácido-Láticas (BAL)**

As bactérias ácido-láticas são um grupo de microorganismo gram-positivos os quais possuem o ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos. As BAL são de importante interesse na produção de alimentos devido a sua influência tanto no sabor quanto na preservação do produto, sendo a sua fermentação bastante utilizada no desenvolvimento de alimentos com características probióticas (DIVYA et al., 2012).

Apesar das BAL constituírem um grupo de bactérias bastante diversificado, todas tem em comum a capacidade de produzir ácido láctico como consequência da fermentação de hexoses. Estas ainda podem ser classificadas como homofermentativas ou heterofermentativas dependendo do produto final da fermentação. As bactérias do tipo homofermentativas produzem ácido láctico como único produto final, enquanto que as heterofermentativas, sendo o *L. casei* parte deste grupo, produzem lactato, dióxido de carbono e etanol em quantidades equivalentes como produtos finais, sendo estas mais influentes na caracterização de aroma e sabor (JAY, 2005; DIVYA et al., 2012).



**Figura 2 – Vias de produção da fermentação homolática e heterolática.**  
**Fonte: Adaptado de JAY (2005).**

Os alimentos fermentados são considerados a principal fonte de obtenção de probióticos, sendo assim, as BAL são os microorganismos mais utilizados na produção de alimentos probióticos a base de laticínios, devido as suas características funcionais comprovadas e por serem consideradas de ingestão segura (DIVYA et al., 2012).

Além disso, essas bactérias são consideradas organismos de biopreservação devido sua influência positiva no fator nutricional, sensorial e de conservação de produtos fermentados. As BAL são capazes de controlar o crescimento de microorganismos patogênicos por meio da produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas e pela competição por nutrientes, tendo por consequência contribuição na preservação, com o aumento da vida de prateleira do produto, e na segurança alimentar para consumo (DIVYA et al., 2012).

Em função das suas funcionalidades, as bactérias ácido-láticas são fundamentais na indústria de alimentos, as quais unem uma vantagem econômica e a promoção e manutenção da saúde dos consumidores (DIVYA et al., 2012).

### 3.2.2 Fabricação de Produtos Fermentados

O mercado de alimentos funcionais apresenta-se em constante crescimento e em 2013 chegou a cerca de US \$ 176,7 bilhões, sendo que destes, 60% a 70% compreendem os alimentos funcionais do tipo probióticos. O desenvolvimento de produtos lácteos com adição de probióticos tem sido bastante apreciado pelo mercado global, entretanto devido ao crescimento de casos de intolerância à lactose nos

últimos anos, os produtos probióticos não lácteos tem ganhado destaque e interesse da indústria, com a criação de produtos à base de soja, cereais, vegetais, suco de frutas e outros (TRIPATHI; GIRI 2014).

No Brasil, os alimentos à base de laticínios estão entre os principais segmentos da indústria alimentícia, ocupando a posição de quarto lugar com um rendimento de cerca de R\$ 59 bilhões no ano de 2015. Segundo o relatório Brasil Food Trends 2020, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, os laticínios fazem parte dos principais ingredientes definidos como tendência do mercado, com destaque aos probióticos, produtos isentos de lactose e alimentos fermentados (BARRETTO et al., 2016).

Para obter a sua funcionalidade e benefícios, os alimentos probióticos devem ser seguros do ponto de vista microbiológicos e sanitários e estar em uma quantidade suficiente ao ser consumido, ou seja, o tipo de microorganismo adicionado deve ser apropriado para o alimento ao que vai ser adicionado e deve sobreviver a todas as etapas de processamento e armazenamento do produto final (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Diversos fatores são responsáveis por deixar as bactérias probióticas viáveis durante todo o processamento de alimentos fermentados, entre eles é possível citar, quanto a matéria-prima: pH, acidez, atividade da água, presença de oxigênio, sal, açúcar e aditivos químicos; quanto ao processamento: tratamento térmico, temperatura, tipo de embalagem e armazenamento; e quanto a microbiologia: tipo de microorganismo, taxa e proporção de inoculação (TRIPATHI; GIRI, 2014).

A temperatura é um fator fundamental quando se trata da viabilidade de microorganismos, sendo 37°C a 43°C a temperatura ótima de crescimento de grande parte das bactérias probióticas. Temperaturas mais altas, acima de 50°C inviabilizam o crescimento bacteriano, assim como a exposição de bactérias anaeróbicas ao oxigênio durante a fermentação. Quanto a temperatura de armazenamento, os produtos probióticos devem ser mantidos à uma temperatura de aproximadamente 4°C, podendo variar de 2°C a 8°C (COSTA et al., 2013).

Visto que a maioria das espécies probióticas são estritamente anaeróbicas, o oxigênio pode afetar a sua sobrevivência e viabilidade, sendo assim, tais microorganismos podem ser afetados por meio dos seguintes mecanismos: toxicidade pela indução da produção de peróxidos tóxicos e de radicais livres, os quais também são tóxicos para as bactérias probióticas. De maneira geral, o gênero *Lactobacillus*

apresenta maior resistência ao oxigênio em comparação às *Bifidubacterium* (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Quanto ao pH, quando este encontra-se muito baixo e conseqüentemente mais ácido, inviabiliza o crescimento das bactérias probióticas, sendo assim, as bebidas probióticas a base de suco de frutas, os quais possuem uma natureza mais ácida, são mais difíceis de serem produzidas pela indústria alimentícia, nesse caso, há possibilidade de adição de aditivos que permitam o crescimento bacteriano. O *Lactobacillus*, por serem mais resistentes, conseguem sobreviver em um meio com valores de pH entre 3,7 e 4,3 (ELLENDERSEN et al., 2012).

### 3.3 ÁGUA DE COCO

A busca por hábitos saudáveis, como a ingestão regular de frutas e derivados, torna o coco um alimento bastante valorizado e de alto consumo no Brasil. A água de coco, obtida da parte líquida do fruto do coqueiro, é pouco calórica e possui sabor adocicado. Sua composição confere ao seu consumidor diversos benefícios, tais como reposição de eletrólitos, sais minerais, vitaminas, aminoácidos e glicídios. Esta bebida atua como um excelente isotônico natural, sendo útil na prevenção e tratamento da desidratação e desnutrição proteica (DIAS et al., 2015; GOMES et al., 2015).

O coco (*Cocos nucifera*) é classificado como drupa monosperma, por ser um fruto carnoso, com apenas uma semente envolvida pelo endocarpo endurecido. A semente é constituída pelo tegumento, localizado entre o endocarpo e o albúmen sólido. Este albúmen é comestível, branco, bastante oleoso, e forma uma grande cavidade central, onde é formada a água de coco, ou albúmen líquido (CARVALHO et al., 2006).

A água de coco assume uma importante função no amadurecimento e germinação do fruto por atuar na formação do albúmen sólido. A sua composição química é alterada durante o processo de maturação, sendo entre o sexto e oitavo mês após o florescimento, o estágio em que a água contém as características sensoriais e nutritivas ideais para o consumo, com a maioria dos sais minerais e açúcares redutores (glicose e frutose) dissolvidos, além de conter o maior volume de endosperma líquido. Após tal período, ocorrem variações prejudiciais à qualidade do

alimento, relacionadas à sua degradação (VENTURINI FILHO, 2005; CARVALHO et al., 2006).

### **3.3.1 Composição e Propriedades Físico-Químicas da Água de Coco**

A composição básica da água de coco contém 93% de água, 5% de açúcares, e também proteínas, vitaminas e sais minerais. É uma bebida de sabor agradável, refrescante e pouco calórica. O grau de maturação do fruto influencia substancialmente na bebida: na quantidade de oligoelementos, no pH, no conteúdo de açúcares e sólidos totais, e inclusive no volume de água. Há diversos micronutrientes presentes na bebida, como vitamina C, vitaminas do complexo B, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, ferro, cobre e sódio. O potássio se destaca como o principal eletrólito durante todo o processo de maturação, correspondendo a cerca de 2/3 do total de minerais (VENTURINI FILHO, 2005).

O pH do albúmen líquido apresenta valores próximos de 5 no período indicado para colheita, caracterizando baixa acidez. O ácido málico é o principal ácido naturalmente presente no líquido. A quantidade de frutose livre, importante para maior doçura da bebida, encontra-se mais elevado até o oitavo mês, havendo uma queda neste teor com o avanço da idade do fruto, devido a síntese da sacarose, a partir da frutose e glicose (CARVALHO et al., 2006).

Dentre as propriedades funcionais atribuídas a água de coco, a reidratação e reposição de eletrólitos se apresentam como as principais. Por ser uma ótima fonte de potássio, principal cátion do fluido intracelular, que participa na manutenção do equilíbrio hídrico normal, na regulação da atividade neuromuscular e promoção do crescimento celular, a água de coco é ideal para consumo de desportistas, pacientes com diarreia severa, quadros de vômitos, aspiração gástrica, fístulas intestinais, pessoas em geral acometidas por hipopotassemia (CARVALHO et al., 2006).

### **3.3.2 Produção de Coco Verde**

A demanda pela água de coco cresceu significativamente, tanto no mercado interno quanto externo, refletindo um expressivo aumento na produção brasileira e em suas áreas de plantio, associado com avanços tecnológicos na condução e manejo dos coqueirais. A evolução do mercado é vista também pela maior preocupação e

interesse do setor industrial em disponibilizar o produto minimamente processado (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2014).

O coqueiro, constituído de uma só espécie (*Cocus nucifera* L.), é uma das palmeiras de maior importância cultivada no Brasil (VENTURINI FILHO, 2005). Há três principais variedades de coqueiros: gigante, anão e híbrido. A variedade híbrida apresenta maiores vantagens de aproveitamento, com dupla finalidade comercial (*in natura* e agroindústria). A maior dificuldade em sua produção é a obtenção das sementes capazes de atender o mercado consumidor. Os coqueiros-gigantes possuem facilidade na adaptação em situações de estresse biológico, sendo encontrados prioritariamente em propriedades com baixo nível de uso tecnológico (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2014).

Segundo dados do levantamento sistemático da produção agrícola feito pelo IBGE, foram produzidos um total de 1,7 bilhões de cocos no país em 2016. Há o plantio em todas as grandes regiões brasileiras, sendo o nordeste responsável por cerca de 75% da produção do país, seguido do sudeste e norte (IBGE, 2017).

No contexto internacional, o Brasil é o 4º maior produtor, liderando o ranking mundial dos países com maior produtividade, maior produção de frutos em menor espaço de plantio, caracterizando um modelo mais intensivo (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2014).

### **3.3.3 Processamento da Água de Coco**

A água de coco encontra-se estéril no interior do fruto, entretanto a sua composição rica em nutrientes, contendo açúcares imediatamente fermentescíveis e baixa acidez, criam o meio ideal para contaminações microbiológicas, em especial mesófilos e termotolerantes, após sua abertura. À vista disso, a adoção de Boas Práticas de Fabricação (BPF) é uma ferramenta indispensável para a garantia da segurança alimentar, evitando assim o crescimento microbiano indesejado por conta de erros no preparo, manipulação e armazenamento (VENTURINI FILHO, 2005; DIAS et al., 2015; GOMES et al., 2015).

A industrialização da água de coco, feita adequadamente, auxilia no aumento da vida útil da bebida, prevenindo ações microbiológicas, químicas e/ ou enzimáticas, que comprometem a qualidade do produto. Além disso, apresenta benefícios em relação ao seu deslocamento, por conta da diminuição do volume e peso

transportados, desta forma reduzindo o custo do transporte, além de possibilitar o consumo fora das regiões produtoras (CARVALHO et al., 2006).

A aplicação de tecnologias de processamento e conservação é uma alternativa satisfatória para garantir um produto de qualidade, seguro e viável para consumo por tempo prolongado. O modo e duração da estocagem varia conforme os métodos de conservação empregados. No comércio da água de coco, as principais etapas do processamento são expostas na tabela 1. Os produtos mais comuns obtidos são: água de coco *in natura*, água de coco resfriada, água de coco congelada, água de coco pasteurizada e congelada, água de coco esterilizada e água de coco ultrafiltrada (CABRAL et al., 2005; VENTURINI FILHO, 2005).

**Tabela 1** – Etapas de processamento da água de coco.

Etapas	Água de Coco					
	<i>In natura</i>	Resfriada	Congelada	Pasteurizada e congelada	Esterilizada	Ultrafiltrada
Recepção	X	X	X	X	X	X
Seleção	X	X	X	X	X	X
Lavagem	X	X	X	X	X	X
Abertura	X	X	X	X	X	X
Extração		X	X	X	X	X
Filtração		X	X	X	X	X
Formulação				X	X	
Pasteurização				X	X	
Esterilização					X	
Pré-resfriamento		X	X	X		X
Ultra-filtração						X
Envase		X	X	X		X
Envase asséptica					X	X
Congelamento			X	X		
Armazenamento		X	X	X	X	X
Comercialização	X	X	X	X	X	X

Fonte: Autores (2018).

**Tabela 2** – Características das principais formas de água de coco comercializadas.

Características	Água de Coco		
	Resfriada	Congelada	Esterilizada

Forma de armazenamento	Refrigeração	Congelamento	Temperatura ambiente
Temperatura de armazenamento	4 a 8 °C	-18 a -20 °C	15 a 30 °C
Vida-de-prateleira	3 a 5 dias	3 a 6 meses	Até 1 ano

Fonte: Autores (2018).

As características físico-químicas e sensoriais da bebida são influenciadas pelo grau de maturação e variedade do fruto, a insolação, a região do plantio e a época do ano. Entre o 5º e 7º mês, o fruto apresenta maior quantidade de líquido, em torno de 400ml, e maior teor de açúcares (CABRAL et al., 2005).

Alguns processos são comuns, independentemente do método de conservação, como a recepção, seleção, lavagem, abertura do coco, extração da água e filtração. Na industrialização, os processos tecnológicos devem ser empregados em tempo otimizado, minimizando a exposição da água de coco com o ar, e com preservação ao máximo das características naturais. As enzimas polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases (POD) presentes na água de coco, quando expostas ao oxigênio, agem de maneira prejudicial: a PPO catalisa a oxidação de compostos fenólicos, cujos produtos se polimerizam, alterando a coloração da bebida, tornando-a mais escura; a POD acelera a deterioração de diversos nutrientes como o ácido ascórbico, e altera o sabor do alimento (CABRAL et al., 2005; CARVALHO et al., 2006).

Após a colheita, os cocos sem injúrias mecânicas podem ser estocados em um período máximo de 15 dias em local fresco (20 °C), ou até 30 dias, caso estejam sob temperatura de refrigeração (12 °C). Depois deste período é iniciado a deterioração, alterando a acidez da água de coco. A área de recepção dos cocos deve ser sempre higienizada adequadamente, sendo selecionados apenas os frutos apropriados a partir de avaliação cuidadosa feita por pessoas treinadas. Em seguida deve ocorrer a sanificação dos cocos de maneira manual ou por sistemas automáticos e enxague com água tratada. A abertura do coco e extração da água são considerados pontos críticos da produção, devido os riscos de ocorrer ações enzimáticas indesejáveis pelo contato da água com a parte fibrosa do fruto na presença de oxigênio, capazes de alterar as características intrínsecas do produto. A água de coco *in natura* é comercializada após a abertura, sendo comumente servido no próprio fruto (VENTURINI FILHO, 2005).

A filtração visa reter partículas ou resíduos, geralmente da casca, evitando assim alterações na cor do líquido. O pré-resfriamento (5 a 10 °C) é uma etapa importante pois a diminuição de temperatura reduz a possível contaminação do produto (VENTURINI FILHO, 2005).

No processamento da água de coco podem ser inseridos açúcares, aditivos (conservantes, antioxidantes e acidulantes) e coadjuvantes de fabricação. Os açúcares adicionados realizam a correção e padronização do teor de sólidos solúveis (°Brix). Os conservantes são agentes biostáticos, inibem ou evitam a proliferação microbiana, e ainda podem prevenir o escurecimento (enzimático e não enzimático). Os antioxidantes também são usados contra a deterioração dos alimentos. Os acidulantes agem através da redução do pH, minimizando a susceptibilidade ao crescimento microbiano (VENTURINI FILHO, 2005).

Na etapa de formulação, costuma ocorrer a correção dos parâmetros de sólidos solúveis e acidez, além da possível inserção de aditivos, afim de inibir a deterioração. Outro tratamento auxiliar, que tem a finalidade de manter a qualidade do produto é a pasteurização, em que a água de coco é submetida à temperaturas entre 75 a 90 °C. Tal processo estende a vida de prateleira para até 6 meses, por reduzir os níveis de contaminação microbiológica (CARVALHO et al., 2006).

Os processos térmicos são eficientes na inativação da atividade enzimática prejudicial à bebida, no entanto, a exposição ao calor prolongada provoca perdas sensoriais no sabor e aroma naturais da água de coco (CARVALHO et al., 2006).

A etapa de congelamento pode ocorrer de forma lenta, sendo não uniforme ao longo da embalagem; e de forma rápida e mais eficiente, pelo uso de soluções criogênicas. O congelamento rápido e sob agitação controlada proporciona um melhor produto final, com formação de pequenos cristais de maneira uniforme. Após descongelado, deve ser consumido imediatamente, ou mantido em refrigeração por no máximo 3 dias, não devendo ser congelado novamente (ROSA; ABREU, 2000).

A esterilização e a ultrafiltração em envase asséptica são os únicos processos capazes de manter o produto final viável em temperatura ambiente. Para tornar o produto estéril comercialmente, há a utilização do sistema UHT (ultra high temperature), que consiste em uma prévia pasteurização, seguida da esterilização, em que a água de coco ficará por poucos segundos em torno de 140 °C. Este processo provoca mudanças substanciais no sabor e aroma. A ultrafiltração é uma espécie de

esterilização à frio, feita por membranas, desta forma não havendo perdas no *flavour* do produto (ROSA; ABREU, 2000; CARVALHO et al., 2006).

### 3.4 LACTOSE

A lactose é um tipo de açúcar que está presente no leite e se classifica como um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e de galactose. Esse dissacarídeo é hidrolisado pela enzima lactase, presente no intestino, e tem como produto as moléculas de D-glicose e D-galactose, tornando assim possível a sua absorção pelo organismo (MATHIÚS et al., 2016; RANGEL et al., 2016).

Este tipo de carboidrato representa uma fonte importante de energia e possui ação na retenção de cálcio e magnésio no organismo, é capaz de expandir a ação da vitamina D e é um componente dos cerebrosídeos (localizados na massa cerebral e mielina nervosa). Além disso, a produção de ácido láctico como produto final da sua fermentação combate o desenvolvimento de bactérias patogênicas, sendo assim bastante apreciado na indústria de alimentos na produção de iogurtes, queijos e bebidas, sejam estas lácteas ou não (SÁ; DELANI; FERREIRA, 2014; ZYCHAR; OLIVEIRA, 2017).

Fundamental para o metabolismo da lactose, visto que esta molécula quando intacta não é capaz de ser absorvida pelas células do trato gastrointestinal (TGI), a enzima lactase é produzida pelos enterócitos e se localiza na extremidade das vilosidades da mucosa do intestino delgado, tendo maior atividade na porção do jejuno e menor atividade no íleo (WORTMANN; SIMON; SILVEIRA, 2013; ZYCHAR; OLIVEIRA, 2017).

Diferente da frutose, que é um monossacarídeo e não precisa de ação enzimática para a “quebra” da sua molécula para ser absorvida, a lactose precisa ser hidrolisada (ENKO et al., 2017). Quando essa hidrólise não ocorre, a lactose não é absorvida pelo TGI, estando a ação da enzima lactase nesse caso associada a polimorfismos de nucleotídeo único, relacionados ao gene codificador da lactase (LCT) (WORTMANN; SIMON; SILVEIRA, 2013; ENKO et al., 2017; ZYCHAR; OLIVEIRA, 2017).

A lactose não hidrolisada, ao chegar ao intestino, assume um papel osmótico, estimulando o trânsito intestinal, pela produção de eletrólitos e fluidos e devido a ação de bactérias colônicas, as quais degradam esta molécula em ácidos graxos de cadeia

curta, dióxido de carbono, hidrogênio, nitrogênio e metano. Tais processos resultam em gases, desconforto abdominal, fezes amolecidas e diarreia (WORTMANN; SIMON; SILVEIRA, 2013; SÁ; DELANI; FERREIRA, 2014; ENKO et al., 2017).

A deficiência da enzima lactase (hipolactasia) leva à Intolerância à Lactose, uma condição cada vez mais frequente e que causa o aparecimento de sintomas como desconforto e dor abdominal, flatulência, diarreia e outros (FUMERY et al., 2017). Estima-se que cerca de 75% da população mundial possui intolerância à lactose, uma doença que, com exceção do tratamento dietoterápico o qual tem como base a exclusão da lactose da dieta, não há nenhum tratamento que leve a cura da doença, sendo a regulação da expressão enzimática da lactase ainda pouco entendida (CUTRIM et al., 2017; FUMERY et al., 2017)

A presença da lactose no leite varia de acordo com a espécie de mamífero, no leite de vaca a concentração de lactose existente é de cerca de 7%, ou seja, a cada 100 mL de leite encontra-se 7 gramas de lactose (SÁ; DELANI; FERREIRA, 2014; RANGEL et al., 2016).

Na indústria de alimentos, a lactose é utilizada no processo de fermentação de bactérias, pois a partir dela é obtido o ácido láctico, o qual é usado na produção de laticínios tais como leite fermentado, iogurtes, queijos e outros (MATHIÚS et al., 2016).

O advento de produtos lácticos com característica probiótica tem se apresentado com uma alternativa de consumo de laticínios por pacientes intolerantes, visto que apesar da presença da lactose, esta é digerida pelas bactérias ácido lácticas presentes nestes produtos durante o processo fermentativo antes do consumo humano (SÁ; DELANI; FERREIRA, 2014).

### 3.5 INTOLERÂNCIA À LACTOSE (IL)

A intolerância à algum alimento é toda resposta anormal do organismo quanto ingerido um alimento onde não ocorre uma resposta imunológica. Sendo assim, a intolerância à lactose (IL) ocorre quando há uma deficiência da atividade ou produção da enzima lactase no intestino (hipolactasia), impossibilitando assim a hidrólise da lactose (MATHIÚS et al., 2016; ZAPATA-CASTILLEJA et al., 2017).

Até os dois anos de idade, a lactose é produzida em abundância, visto que a quantidade de leite ingerida nessa faixa etária de vida é bastante elevada. Entretanto, essa produção é reduzida com o passar dos anos, sendo assim, como a capacidade

de digerir a lactose depende da atividade desta enzima, a IL acomete grande parte da população, seja ela criança ou adulta (WORTMANN; SIMON; SILVEIRA, 2013; MATHIÚS et al., 2016).

É estimado que cerca de 65% a 75% da população mundial possui intolerância à lactose, a qual acomete pessoas de diferentes idades e raças e possui três tipos: congênita, primária e secundária. (MATHIÚS et al., 2016; RANGEL et al., 2016; ZAPATA-CASTILLEJA et al., 2017).

Quanto ao metabolismo da lactose, este pode ser classificado em diferentes tipos. A deficiência de lactose é quanto há uma diminuição da atividade da lactase; a deficiência congênita de lactase é considerada rara e é verificada em crianças logo ao nascimento; a lactase não persistente é hipolactasia em adultos; a hipolactasia secundária ocorre por dano na mucosa intestinal (onde ocorre a produção da lactase) devido doença celíaca, doença de Crohn e outras gastroenterites (MATHIÚS et al., 2016; BAYLESS; BROWN; PAIGE, 2017).

Apesar da diminuição da atividade e produção da lactase ser um fator importante na IL, não existe uma quantidade de lactose definida que pode ser ingerida sem que desencadeie ou não sintomas. Essa quantidade pode variar de indivíduo para indivíduo, de acordo com o quanto de lactose que foi ingerida, o grau de deficiência da enzima de cada organismo, o tipo de alimento ingerido e a composição da microbiota intestinal individual (WORTMANN; SIMON; SILVEIRA, 2013; MATHIÚS et al., 2016).

A deficiência de lactase faz com que a lactose ao ser ingerida chegue ao cólon, sendo assim fermentada por bactérias a ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta, gás hidrogênio e metano, os quais são responsáveis pelos sintomas da intolerância tais como o desconforto abdominal (MATHIÚS et al., 2016; ZAPATA-CASTILLEJA et al., 2017).

Entre os principais sintomas da IL estão o aparecimento de distensão e dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos, espasmos musculares e flatulência (ZAPATA-CASTILLEJA et al., 2017). Se não tratada corretamente, a IL pode levar a déficits no crescimento e desenvolvimento, redução da densidade mineral óssea, doenças dermatológicas, exaustão e outros (MATHIÚS et al., 2016; SHARMAA; LEBLANCA, 2017).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, nos laboratórios de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC) e de Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

### 4.1 MATERIAL PROBIÓTICO E ÁGUA DE COCO

As bactérias probióticas utilizadas, *Lactobacillus casei* shirota, foram obtidas do leite fermentado comercializado adquirido dentro das condições adequadas para consumo de acordo com a legislação vigente, e mantidos sob refrigeração (4 °C) até o momento de sua utilização.

O substrato utilizado para fermentação teve como matéria-prima apenas a água de coco, e para a elaboração da bebida foram utilizadas duas formulações: uma com água de coco industrializada (F1) e outra com a água de coco *in natura* (F2).

A água de coco industrializada obtida possuía em sua formulação: sacarose (menos de 1%) e antioxidante metabissulfito de sódio. Apresentava-se em suas condições originais de comercialização, estéril e envasilhado em sistema Ultra High Temperature (UHT) em embalagem Tetra Pak de 200 mL, com rótulo contendo os dizeres legais exigidos pela legislação vigente (denominação de venda do alimento, lista de ingredientes, identificação do lote, prazo de validade, registro em órgão competente). A água foi retirada da embalagem original, distribuída em duplicata em garrafas de vidro autoclavadas. Transferiu-se para cada garrafa, 200 mL e congeladas em freezer (-18 °C) até o momento da utilização.

A água de coco *in natura* foi obtida de cocos verdes (*Cocos nucifera*) maduros adquiridos em uma feira livre do Bairro Guamá, em Belém (PA). Os cocos foram lavados em água corrente e perfurados com auxílio de uma faca. A água foi retirada, com remoção de partículas suspensas, distribuída em duplicata em garrafas de vidro (200 mL/cada) e autoclavadas por 15 minutos em 121 °C. Posteriormente, foram congeladas (-18 °C) em freezer até o momento da utilização.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Análises nas Águas de Coco

Para análise microbiológica das águas de coco, houve avaliação quanto a presença de coliformes termotolerantes (45 °C), tendo seu resultado expresso em Número Mais Provável por mL de água (NMP/mL) (APHA, 2001).

As águas de coco foram caracterizadas quanto ao seu pH inicial, sendo realizada leitura direta com pHmetro (Bel Engineering®) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

#### 4.2.2 Elaboração da Bebida Probiótica

Para a elaboração da bebida probiótica, houve o descongelamento das águas de coco, descritas em 4.1, em aparelho de banho-maria digital, com temperaturas inferiores à 50 °C. Em seguida, ocorreu a adição de solução de hidróxido de sódio 0,1N para regular a um pH de 6,5 a água de coco industrializada e a água de coco *in natura*, que tinham como pH inicial 4,62 e 4,56, respectivamente, seguido do inóculo de 3% (v/v) de leite fermentado comercializado. A fermentação da bebida ocorreu por 48 h em estufa a 36 °C.

#### 4.2.3 Avaliação da Bebida Probiótica

No período de 48 h em que decorreu a fermentação, houve a determinação do crescimento microbiano e avaliação da estabilidade físico-química (pH e acidez total titulável), a cada intervalo de 6 h pela metodologia de IAL, 2008.

As análises das bactérias lácticas ocorreram em duplicata segundo descrito em APHA (2001). Alíquotas da bebida probiótica foram retiradas, em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, para análise do desenvolvimento dos *Lactobacillus casei* na água de coco, sendo realizada diluição seriada em água peptonada esterilizada até se obter a diluição  $10^{-7}$ . Em seguida, ocorreu o inóculo das diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  por método *pour-plate* em meio Man Rogosa Shape (MRS) Ágar (Sigma®). As placas foram incubadas invertidas a 36 °C por 72 h. Posterior a este período, ocorreu a contagem das colônias de bactérias lácticas, tendo seu resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônia por mL de amostra (UFC/mL).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bebidas formuladas, com substrato de água de coco industrializada (F1) e substrato de água de coco *in natura* (F2), apresentaram características organolépticas similares. Ambas possuíram odor característico da fermentação bacteriana, análogo ao do leite fermentado, e coloração esbranquiçada.

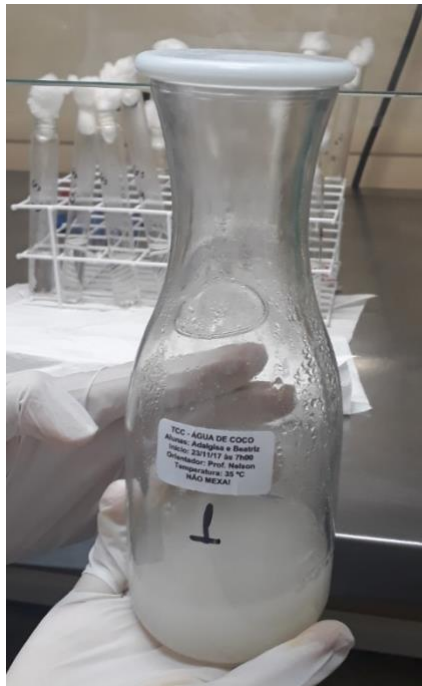


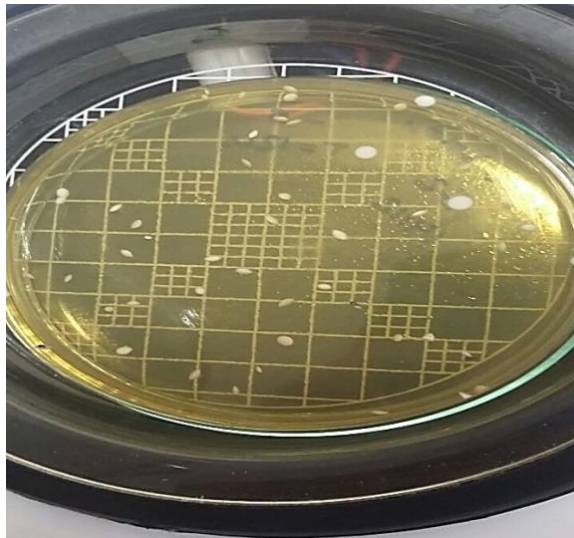
Figura 3 – Bebida probiótica a base de água de coco industrializada.  
Fonte: Autores (2018).

O líquido se apresentou homogêneo e límpido de início, porém após 18 h e 30 h de fermentação ocorreu precipitação da bebida com o substrato de água de coco *in natura* e da bebida com água de coco industrializada, respectivamente. Tal fato também ocorreu no estudo de Silva e Ferrari (2016), onde foi observado material precipitado após alguns dias de fermentação de bebida probiótica a base de suco de uva com adição de *Lactobacillus paracasei*.

### 5.1 CRESCIMENTO BACTERIANO

Para que a bebida formulada apresente potencial probiótico, esta deve conter *Lactobacillus* na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/mL para uso diário do produto pronto para o consumo, de acordo com a legislação atual (BRASIL, 2008).

Os resultados obtidos quanto ao crescimento bacteriano foram adequados e indicam a viabilidade do produto. Nos dois tipos de água de coco, industrializada e *in natura*, foram alcançados os valores em torno de  $10^8$  a  $10^9$  de concentração bacteriana, o que demonstra potencial probiótico do produto nos dois tipos de substratos.



**Figura 4 – Aspecto colonial dos *Lactobacillus casei* shirota da bebida formulada em meio ágar MRS.**  
Fonte: Autores (2018).

Após análise do crescimento bacteriano, foi observado que o tempo de fermentação ideal para a viabilidade probiótica da bebida formulada à base de água de coco industrializada foi o de 24 h, onde a faixa de colônias viáveis se apresentou no valor de  $6,75 \times 10^8 \pm 4,17 \times 10^8$  UFC/mL. Os demais valores de contagem das células por tempo de incubação estão expostos na Tabela 3, os tempos 30 h, 36 h e 48 h apresentaram elevado crescimento bacteriano, acima do preconizado na legislação.

**Tabela 3 – Contagem de células nas formulações em duplicata em UFC/mL por tempo de incubação na diluição  $10^{-6} \pm dp$ .**

Formulação	Tempo de Incubação (h)					
	0	6	12	18	24	48
F1	$4,15 \times 10^7 \pm$ $1,63 \times 10^7$	$9,00 \times 10^7 \pm$ $2,83 \times 10^7$	$1,05 \times 10^8 \pm$ $4,95 \times 10^7$	$2,03 \times 10^8 \pm$ $3,54 \times 10^7$	$6,75 \times 10^8 \pm$ $4,17 \times 10^8$	-
	$5,4 \times 10^8 \pm$ nd	$7,4 \times 10^8 \pm$ $1,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9 \pm$ $4,5 \times 10^8$	-	-	-

nd: Não determinado; dp: Desvio padrão  
- Incontável.

Fonte: Autores (2018).

Na bebida F2, foram utilizados os mesmos mecanismos para a análise do crescimento bacteriano e contagem de células, sendo o tempo ideal de incubação igual a 12 h, onde a quantidade de colônias se apresentou na faixa de  $2,5 \times 10^9 \pm 4,5 \times 10^8$  UFC/mL, ideal para potencial probiótico.

## 5.2 ANÁLISE DE COLIFORMES

A utilização de matéria-prima segura é um princípio geral higiênico-sanitário, importante e necessário para a produção de um produto alimentício de qualidade e próprio para o consumo humano, seguindo as boas práticas de fabricação (BRASIL, 1997).

As análises microbiológicas realizadas nas águas de coco, anteriormente à formulação da bebida, indicaram ausência de coliformes totais e termotolerantes em NMP.mL<sup>-1</sup>.

O valor máximo permitido de coliformes a 45 °C em água de coco é de 100 NMP/mL, devendo ser ausente de *Salmonella* sp em 25 mL (BRASIL, 2001). O produto analisado encontra-se de acordo com os padrões legais estabelecidos, pois os resultados analíticos demonstram a ausência de microorganismos que representem riscos à saúde do consumidor. As condições sanitárias satisfatórias estão em conformidade com o processo de esterilização aplicado nos substratos avaliados e com a boa manipulação da matéria-prima.

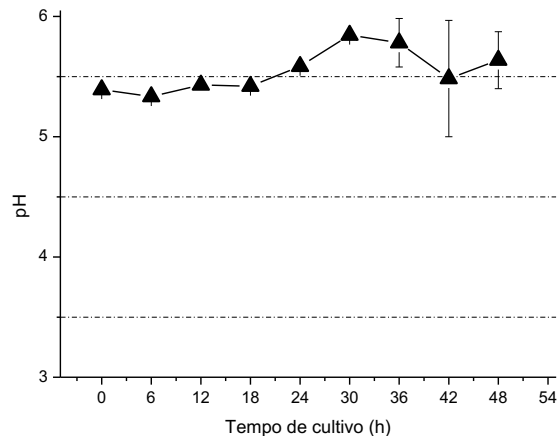
## 5.3 ANÁLISE DE pH E ACIDEZ

As condições de fermentação, bem como os parâmetros físico-químicos do substrato, influenciam diretamente no crescimento bacteriano. A correção do pH inicial das águas de coco para 6,5, anterior a inoculação dos *L. casei*, ocorreu com o intuito de promover a faixa de pH ótima para o desenvolvimento das bactérias lácticas, que podem crescer em pH levemente ácido a neutro e temperaturas entre 2 a 53 °C. Sendo a faixa de temperatura ideal para o gênero *Lactobacillus* entre 30 a 40 °C, e o pH ótimo entre 5,5 a 6,2 (ELLENDERSEN et al., 2012; COSTA et al., 2013).

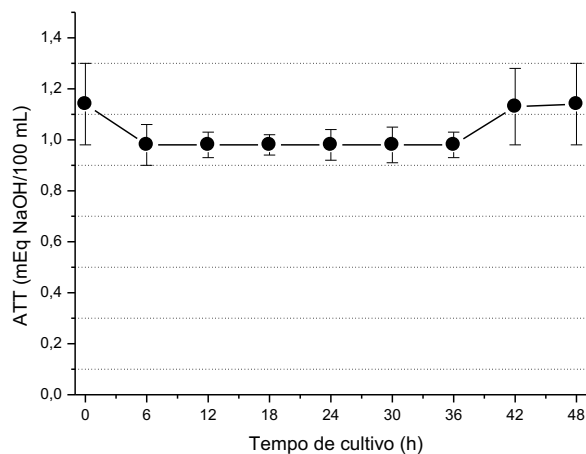
Para atingir o pH ideal de crescimento das bactérias lácticas, foi utilizada a solução de NaOH 0,1 N. Brasil (2007) permite o uso de hidróxido de sódio como aditivo

para regular a acidez em quantidade mínima suficiente para exercer sua função, na categoria de alimentos não alcoólicos, tais como a bebida fermentada proposta.

As determinações de pH e acidez, da bebida elaborada à base de água de coco industrializada, demonstraram pouca variação no período analisado de 48 h de fermentação. O pH manteve-se entre 5,0 e 6,0. A acidez apresentou leve aumento nas últimas 12 h, assim como mostra os gráficos das Figuras 5 e 6.



**Figura 5 – Gráfico de variação do pH durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco industrializada (F1).  
Fonte: Autores (2018).**

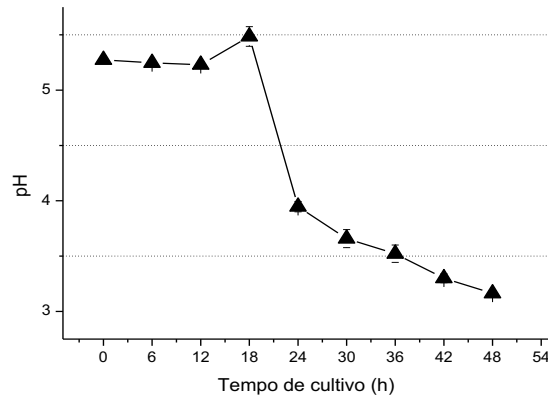


**Figura 6 – Gráfico de variação de acidez durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco industrializada (F1).  
Fonte: Autores (2018).**

Ramos et al. (2013) formularam 3 bebidas lácteas fermentadas sabor cajá (com 40% de soro do leite e 15%, 20% e 25% de polpa da fruta) com inóculo de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*, fermentados em estufa a 42°C por aproximadamente 4 h. Notou-se resultados praticamente

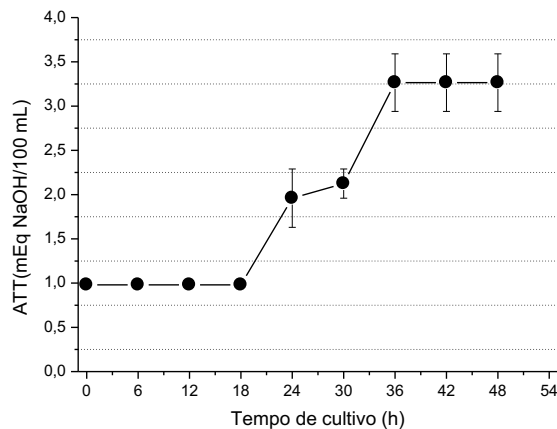
constantes, semelhantes ao encontrado no presente trabalho na F1, quanto o pH e acidez.

Por outro lado, a bebida formulada F2 apresentou resultados diferentes, com um decréscimo acentuado do pH após as 24 h iniciais de fermentação, e um aumento da acidez mais expressivo.



**Figura 7 – Gráfico de variação do pH durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco *in natura* (F2).**

Fonte: Autores (2018).



**Figura 8 – Gráfico de variação de acidez durante a fermentação da bebida probiótica à base de água de coco *in natura* (F2).**

Fonte: Autores (2018).

Pereira et al. (2011), analisaram 11 diferentes formulações de suco de maçã e caju com *L. casei* inoculados, fazendo variações no pH inicial, temperatura de fermentação e quantidade de inóculo. Após 24 h de fermentação, as formulações submetidas ao pH inicial de 6,4, temperatura de 30 °C, e inóculos de 7,0, 7,3 e 7,48 Log UFC/mL, apresentaram resultados similares aos obtidos em F2, sofrendo um decréscimo do pH para 4,55, 4,26 e 4,17, respectivamente.

Nota-se que os dois substratos de água de coco apresentaram perfis diferentes quanto ao teor de pH e acidez. O aumento da acidez e consequente diminuição do pH observado na formulação F2 sugere uma melhor adaptação das bactérias àquele meio, visto que a água de coco *in natura* apresenta um perfil nutricional melhor e mais rico que a água de coco industrializada.

A relação inversa de pH e acidez total titulável relacionada com o crescimento bacteriano desejado, sugere a proliferação das bactérias ácido lácticas, as quais consomem açúcares para a produção de ácido lático (SÁ; DELANI; FERREIRA, 2014). É conhecido que o *Lactobacillus casei* shirota é capaz de fermentar diferentes tipos de açúcar, entre eles a galactose, lactose, D-lactose, D-frutose, sorbitol e outros (GONZÁLEZ-VÁZQUEZ et al., 2015).

Sendo assim, as bactérias fazem uso dos nutrientes do substrato para o seu processo fermentativo e proliferação, liberando assim mais ácido lático e diminuindo o pH e elevando a acidez do produto final (GONZÁLEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). No caso da água de coco industrializada o crescimento bacteriano ocorreu, porém em um intervalo de tempo maior, visto que o processamento industrial altera o perfil nutricional do produto. A adição de antioxidantes na água de coco industrializada pode ser uma possível explicação para a estabilidade do pH e acidez da formulação F1.

#### 5.4 ÁGUA DE COCO INDUSTRIALIZADA E ÁGUA DE COCO *IN NATURA*

Ao compararmos as duas formulações, F1, com substrato de água de coco industrializada e F2, com substrato de água de coco *in natura*, é possível pontuar algumas disparidades. Apesar de as duas formulações apresentarem um resultado satisfatório quanto ao potencial probiótico (crescimento bacteriano na faixa de  $10^8$  a  $10^9$ ), a formulação F2 apresentou as características desejadas de maneira mais eficiente.

F1 alcançou a faixa de crescimento bacteriano desejado após 24 h de fermentação, com média de pH e acidez praticamente constante, apresentando pequenas alterações. Enquanto que a F2 alcançou a faixa de  $10^8$ - $10^9$  UFC/mL no tempo de 12 h de fermentação, além de apresentar valores aumentados de acidez no decorrer das 48 h de análise, com consequente diminuição do pH.

A formação de material precipitado após 18 e 30 h de fermentação na bebida com o substrato de água de coco *in natura* e na bebida industrializada,

respectivamente, pode ser explicado pela formação em excesso das Bactérias Ácido-Láticas (BAL), o que acarreta em morte celular e perda da viabilidade dos microorganismos, com relativo aumento da acidez e diminuição no pH. Segundo Pereira (2011), a temperatura tem influência maior sobre a formação da biomassa do que o valor do pH, portanto, é possível concluir que o tempo de fermentação à 30°C também influenciou na precipitação do material biológico, sendo o tempo de fermentação proposto (48h) superior ao necessário para crescimento ótimo dos *L. casei*.

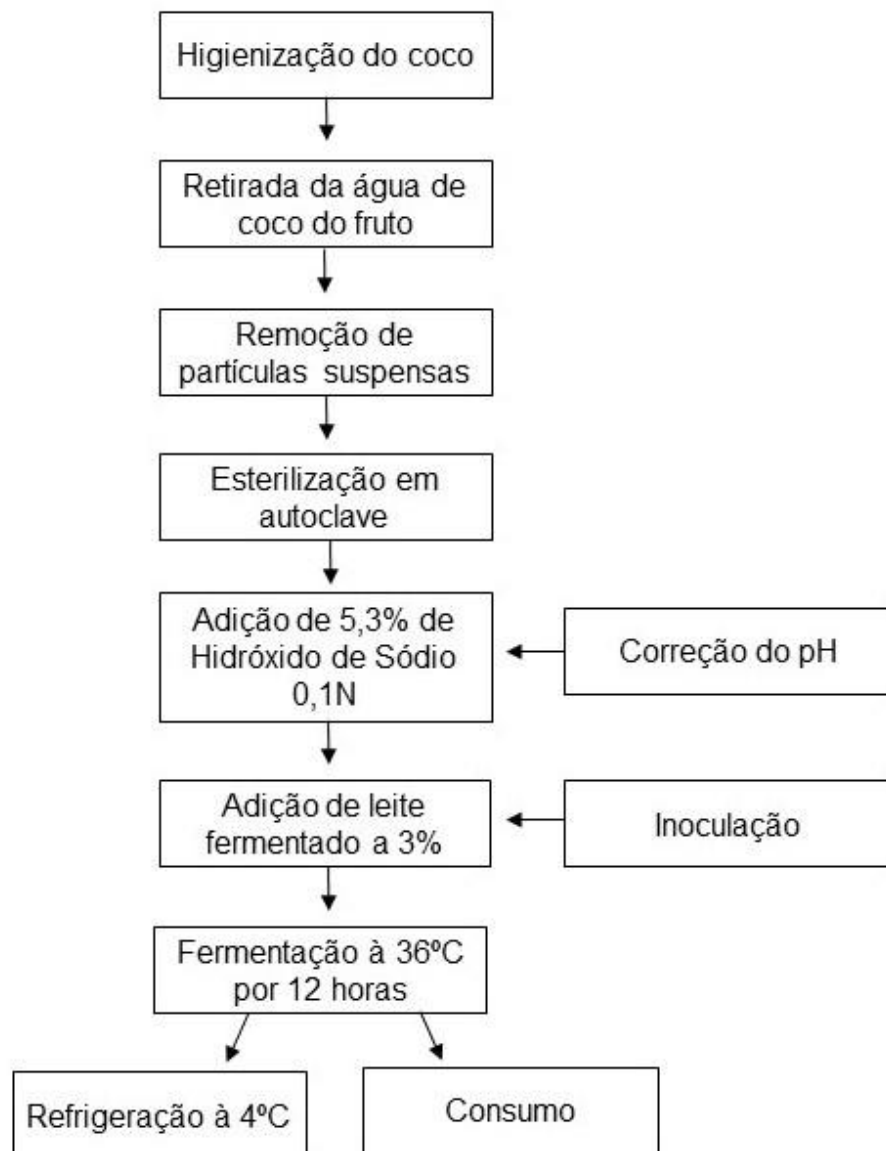
Os resultados mais satisfatórios foram obtidos da formulação 2, a qual apresenta como substrato a água de coco *in natura*, visto que esta, por não passar pelas etapas do processo de industrialização, mantém um perfil nutricional melhor, com maior teor de nutrientes, apesar do processo de esterilização ao qual foi submetida no início do processo de formulação da bebida em questão.

As bactérias, assim como todo e qualquer ser vivo, precisam de nutrientes e condições favoráveis para o seu desenvolvimento, e a água de coco mostrou-se ser um excelente meio para a proliferação de tais microorganismos. Sua composição é basicamente de água, açúcares imediatamente fermentescíveis relacionados à doçura natural da bebida, proteínas, vitaminas e minerais, possui baixa acidez e pH em torno de 5 (VENTURINI FILHO, 2005), tais condições são consideradas ideais para o desenvolvimento e sobrevivência das BAL (COSTA et al., 2013).

Sendo assim, para a elaboração da bebida probiótica de água de coco proposta, esta deve ter seu substrato esterilizado, afim de evitar contaminação e proliferação de patógenos, com posterior adição dos *Lactobacillus casei shirota*. Após a inoculação, a mistura deve permanecer a uma temperatura em torno de 35°C e 36°C para a fermentação durante um período de 12 horas; alcançado este tempo, a bebida deve ser consumida ou refrigerada a 4°C com o objetivo de retardar a proliferação das BAL e assim aumentar o tempo de viabilidade do produto final. O processo completo está descrito na figura 9.

Tendo em vista que a amostra de leite fermentado adicionada à água de coco foi de uma quantidade pequena, 3% em 200mL, acredita-se que a diluição no meio representa um quantitativo final de lactose mínimo em relação ao volume total do produto. Além disso, visto que as bactérias ácido-láticas fazem uso da lactose, neste caso presente no leite fermentado, para a produção do ácido lático durante o processo de fermentação, é sugestivo o consumo da lactose disponível, sendo assim, a

presença deste açúcar deve ser mínima ou nenhuma quando o produto estiver pronto para consumo (SÁ; DELANI; FERREIRA, 2014). Entretanto, faz-se necessário a realização de mais análises como a cromatografia líquida de alta eficiência, para a verificação do teor de lactose do produto final, e assim, ser avaliado se o consumo é seguro para intolerantes à lactose.



**Figura 9 – Fluxograma de formulação da bebida probiótica a base de água de coco *in natura* (F2).**

**Fonte: Autores (2018).**

Fazem-se necessárias análises futuras para a mensuração do perfil nutricional do produto final, do teor de lactose e para a definição do tempo de prateleira e armazenamento ideal do produto proposto, além da análise sensorial para aceitação do produto final.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos foram satisfatórios e comprovam a efetividade probiótica da bebida formulada. Apesar de serem dados iniciais, existe boa perspectiva de aplicabilidade futura no desenvolvimento de um produto final que possa ser elaborado com segurança em residências, tal como existe com a produção de logurtes caseiros.

O interesse pelos alimentos funcionais e pelos benefícios gerados por eles são crescentes devido ao aumento da preocupação quanto à qualidade de vida e do advento das doenças crônicas não transmissíveis. A água de coco mostrou-se ser um excelente substrato, tanto por seu perfil nutricional adequado quanto pela facilidade de aquisição, além de permitir o crescimento das *L. casei*.

A bebida formulada tem potencial probiótico e acredita-se ser isenta de lactose devido a ação das bactérias ácido-láticas, sendo assim, pode ser consumida por um público crescente no mercado os quais não consomem produtos derivado de laticínios, como indivíduos intolerantes à lactose, com alergia à proteína do leite de vaca e veganos.

Apesar dos bons resultados obtidos, fazem-se necessários outras análises para melhor construção do perfil nutricional do produto final: avaliar o perfil de ácidos orgânicos utilizados; avaliar estabilidade microbiológica e físico-química durante o tempo de prateleira; avaliar o crescimento e tempo de viabilidade celular em temperatura de refrigeração; determinar quantidade de lactose do produto pronto para consumo.

## REFERÊNCIAS

BARRETTO, L. C. O.; REIS, M. F. T.; MOREIRA, J. J. S.; SANTOS, J. A. B. Tendências biotecnológicas da indústria láctea a partir da prospecção de patentes e artigos. **GEINTEC**, São Cristóvão, v. 6, n. 4, p. 3583-3590, 2016.

BAYLESS, T. M.; BROWN, E.; PAIGE, D. M. Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. **Current Gastroenterology Reports**, New York, v. 19, n. 23, p. 3-11, 2017.

BORGES, G. M. Health Transition in Brazil: regional variations an divergence/ convergence in mortality. **Caderno de Saúde Pública**, v. 33, n. 8, p. 1-15, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 02 de 07 de janeiro de 2002: Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm)>. Acesso: 12 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 259 de 20 de setembro de 2002: Regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_259\\_2002.pdf/e40c2ecb-6be6-4a3d-83ad-f3cf7c332ae2](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_259_2002.pdf/e40c2ecb-6be6-4a3d-83ad-f3cf7c332ae2)>. Acesso: 10 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 326 de 30 de julho de 1997: Regulamento técnico sobre Condições Higiênicas-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0326\\_30\\_07\\_1997.html](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0326_30_07_1997.html)>. Acesso: 08 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12 de 02 de janeiro de 2001: Regulamento técnico sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso: 10 dez. 2017.

CABRAL, L. M. C.; PENHA, E. M.; MATTA, V. M. **Água de coco verde refrigerada**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 34 p.

CARDOSO, B. R.; FLORENCE, A. C. R. Prebióticos e probióticos. In: CHAVES, D. F. S. **Compostos Bioativos dos Alimentos**, São Paulo: Valéria Paschoal, 2015. p. 244-278.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; MAIA JR, G. A.; Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 437-452, 2006.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; JESUS, A. L. T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 261-266, 2013.

CUTRIM, C. S.; BARROS, R. F.; FRANCO, R. M.; CORTEZ, M. A. S. *Escherichia coli* O157:H7 survival in traditional and low lactose yogurt during fermentation and cooling periods. **Ciência Animal Brasileira.**, Goiânia, v.18, p. 1-9, 2017.

DIAS, F. M.; FIGUEIREDO, R. M.; SOUZA, J. R.; SANTANA, C. M. P. Qualidade microbiológica da água de coco comercializada em carrinhos ambulantes, na região central do município de Vitória da Conquista, BA. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 17, n. 1, p. 97-103, 2015.

DIVYA, J. B.; VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; ISMAIL, B.; PANDEY, A. Probiotic fermented foods for health benefits. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 12, n. 4, p. 1-14, 2012.

DOWNES, F. P. ITO, K (ed.), Compendium of Methods for the microbiological examination of foods, 4. ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001.

DUNFORD, N. T. **Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing**. 1 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012.

ELLENDERSEN, L. S. N.; GRANATO, D.; GUERGOLETTA, K. B.; WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 1-11, 2012.

ENKO, D.; WAGNER, H.; KRIEGSHAUSER, G.; BRANDMAYR, W.; HALWACHS-BAUMANN, G.; SCHNEDL, W. J.; ZELZER, S.; MANGGE, H.; MEINITZER, A. Assessment of tryptophan metabolism and signs of depression in individuals with carbohydrate malabsorption. **Psychiatry Research**, 22 Set. 2017. In press.

FLESCHE, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D. C. O uso terapêutico dos simbióticos. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 27, p. 3, p. 206-209, 2014.

Food and Agriculture Organization (FAO). Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for the evaluation; **Report of a Joint FAO/WHO expert consultation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**, Argentina, 2001.

FUMERY, M.; SPECA, S.; LANGLOIS, A.; DAVILA, A. M.; DUBUQUOY, C.; GRAUSO, M.; MENA, A. M.; FIGEAC, M.; METZGER, D.; ROUSSEAU, C.; COLOMBEL, J. F.; DUBUQUOY, L.; DESREUMAUX, P.; BERTIN, B. Peroxisome proliferator-activated

receptor gamma (PPARc) regulates lactase expression and activity in the gut. **EMBO Molecular Medicine**, Bethesda, v. 9, n. 11, p. 1471-1481, set. 2017.

GOMES, N. W. S.; ARAÚJO, N. F. O.; MACEDO, J. M. Avaliação microbiológica da água de coco obtida por diferentes métodos de conservação no município de Porto Velho, Rondônia. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 2, p. 45-51, 2015.

GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R.; AZAOLA-ESPINOSA, A.; MAYORGA-REYES, L.; REYS-NAVA, L. A.; SHAH, N. P.; RIVERA-ESPINOZA, Y. Isolation, Identification and Partial Characterization of a Lactobacillus casei Strain with Bile Salt Hydrolase Activity from Pulque. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, New York, v. 7, n. 4, p. 242-248, nov. 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**/coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Nov. 2017. Disponível em: < ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Agricola/Levantamento\_Sistematico\_da\_Producao\_Agricola\_[mensal]/Fasciculo/lspa\_201701.pdf >. Acesso em: 17 nov. 2017.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli as a quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P. ITO, K (ed.), Compendium of Methods for the microbiological examination of foods, 4. ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Capítulo 8, p. 69-82.

MARKOWIAK, P; SLIZEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 1021, p. 1-30, 2017.

MARTINS, C. R; JESUS JÚNIOR, L. A. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014. 51 p.

MATHIÚS, L. A.; MONTANHOLI, C. H. S.; OLIVEIRA, L. C. N.; BERNARDES, D. N. D. A.; PIRES, A.; HERNANDEZ, F. M. O. Aspectos atuais da intolerância à lactose. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 37, n. 1, p. 46-52, jan.-abr., 2016.

MIRAGHAJANI, M.; DEHSOUKHTEH, S. S.; RAFIE, N.; HAMEDANI, S. G.; SABIHI, S.; GHIASVAND, R. Potential mechanisms linking probiotics to diabetes: a narrative review of the literature. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 135, n. 2, p. 169-178, 2017.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Vol.2 – Alimentos de Origem Animal**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, p. 1276-1283, 2011.

QUILICI, F. A. Manipulation of the intestinal microbiota: the medicine revolution of the 21<sup>st</sup> century. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, v. 2, p. 83-84, 2017.

RAMOS, A. C. S. M.; STAMFORD, T. L. M.; MACHADO, E. C. L.; LIMA, F. R. B.; GARCIA, E. F.; ANDRADE, S. A. C.; SILVA, C. G. M. Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2817-2828, 2013.

RANGEL, A. H. N.; SALES, D. C.; URBANO, S. A.; GALVÃO JÚNIOR, J. G. B.; ANDRADE NETO, J. C.; MACÊDO, C. S. Lactose intolerance and cow's milk protein allergy. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 36, n. 2, p. 179-187, abr.-jun., 2016.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. **Água de coco**: métodos de conservação. Fortaleza: Embrapa CNPAT/SEBRAE-CE, 2000. 40p. (Documentos 37)

SÁ, P. T. M.; DELANI, T. C. O.; FERREIRA, A. A. Aspectos etiológicos da hipolactasia. **Uningá Review**, Maringá, v. 20, n. 2, p. 123-128, out./dez. 2014.

SANDERS, M. E.; LENOIR-WIJNKOOP, I; SALMINEN, S.; MERENSTEIN, D. J.; GIBSON, G. R.; PETSCHOW, B. W.; NIEUWDORP, M.; TANCREDI, D. J.; CIFELLI, C. J.; JACQUES, P.; POT, B. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1309, p. 19-29, 2014.

SHARMA, S. K.; LEBLANC, R. M. Biosensors based on  $\beta$ -galactosidase enzyme: Recent advances and perspectives. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 1-11, out. 2017.

SILVA, S. B.; FERRARI, J. **Development of probiotic grape juice and lactobacillus paracasei viability under cold storage**. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 25, 2016, Gramado, Anais do XX Simpósio Internacional de Alimentos da CIGR Sessão VI, Gramado, SBCTA Regional, 2016, p.1-6.

SILVA, T. J.; MARTINS, A. D. O.; PEREIRA, D. C. S.; BENEVENUTO, W. C. A. N. Bebida Láctea Funcional a Base de Soro Fluido e em Pó: Qualidade Físico-Química e Microbiológica. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 31, n. 268/269, p.122-127, mai.-jun. 2017.

SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Fermentation Processes Engineering in the Food Industry**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2013.

TAKADA, M.; NISHIDA, K.; GONDO, Y.; KIKUCHI-HAYAKAWA, H.; ISHIKAWA, H.; SUDA, K.; KAWAI, M.; HOSHI, R.; KUWANO, Y.; MIYAZAKI, K.; ROKUTAN, K. Beneficial effects of *Lactobacillus casei* strain shirota on academic stress-induced

sleep disturbance in healthy adults: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 2, p. 153-162, 2017.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas**: Matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2005.

WEN, L.; DUFFY, A. Factors influencing the gut microbiota, inflammation and type 2 diabetes. **The journal of Nutrition**, 13 jul. 2017.

WORTMANN, A. C.; SIMON, D.; SILVEIRA, T. R. Análise molecular da hipolactasia primária do tipo adulto: uma nova visão do diagnóstico de um problema antigo e frequente. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 57, n. 4, p. 335-343, out./dez. 2013.

WU, C.; HUANG, J.; ZHOU, R. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 393-404, mar. 2017.

ZAPATA-CASTILLEJA, C. A.; MONTES-TAPIA, F. F.; TREVIÑO-GARZA, C.; MARTÍNEZ-COBOS, M.; GARCÍA-CANTÚ, J.; ARENAS-FABBRI, V.; O-ESCAMILLA, N.; O-CAVAZOS, M. Comparison of an increased waist circumference with a positive hydrogen breath test as a clinical predictor of lactose intolerance. **Archivos Argentinos Pediatría**, v. 115, n. 2, p. 148-154, 2017.

ZYCHAR, B. C.; OLIVEIRA B. A. Fatores desencadeantes da intolerância á lactose: metabolismo enzimático, diagnóstico e tratamento. **Atas de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 35-46, jan./mar. 2017.