



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINA SAORI ISHII MAURO

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE LEITE DE
COCO FERMENTADO**

CAROLINA SAORI ISHII MAURO

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE LEITE DE
COCO FERMENTADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mauro, Carolina Saori Ishii.

Desenvolvimento de bebida à base de leite de coco fermentado / Carolina Saori Ishii Mauro. - Londrina, 2018.

112 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2018. Inclui bibliografia.

1. Lactobacilo - Tese. 2. Alimentos funcionais - Tese. 3. Avaliação sensorial - Tese. 4. Fermentação - Tese. I. Garcia, Sandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CAROLINA SAORI ISHII MAURO

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE LEITE DE COCO
FERMENTADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Karla Bigetti Guergoletto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Cínthia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 20 de abril de 2018.

À minha mãe Iria Hiromi Ishii, meu exemplo de coragem, força e dedicação. Pelo amor incondicional e incentivo durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Sandra Garcia, por me acolher e me dar a oportunidade de trabalhar com o que escolhi, pelos ensinamentos, paciência e apoio ao longo do desenvolvimento e realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelos ensinamentos compartilhados, por estarem sempre à disposição para auxiliar nas dúvidas durante a execução do projeto.

À professora Dr^a Suzana Nixdorf, do laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (DIA), pela disponibilização do aparelho para determinações cromatográficas.

Ao doutorando Lycio Shinji Watanabe pelo auxílio na realização das análises cromatográficas, pela dedicação, paciência e disponibilidade.

Às doutorandas Fernanda Silva Farinazzo e Maria Thereza Carlos Fernandes pela amizade, conversas, toda ajuda e carinho. Vocês foram meus presentes do mestrado e foram essenciais para tornar os dias de laboratório mais leves e alegres.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, em especial Cíntia Machado, José Renato da Silva, Marcela Terhaag e Natália Niguma pela companhia, conversas, auxílios e força.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela disponibilidade e auxílio dispensados.

Aos meus pais Iria e Rodiney, que me deram a oportunidade de estudar e me mostraram o caminho da pesquisa. À minha família, por todo amor, incentivo e apoio na minha formação profissional. Ao meu namorado Carlos Henrique Pimentel, pelo amor, companheirismo e confiança no meu potencial.

Aos meus amigos desde sempre João Guilherme, Melina, Andrezza e Isabelle pela atenção, conselhos e incentivo. A distância não é nada quando se tem amigos de verdade. Aos meus amigos Lucila, Priscila e Diego pelo apoio, carinho e por estarem sempre presentes.

Meu sincero agradecimento a todos que, de alguma forma, torceram e contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”

(Albert Einstein)

MAURO, Carolina Saori Ishii: **Desenvolvimento de bebida à base de leite de coco fermentado**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O microrganismo *Lactobacillus reuteri* é capaz de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e produzir efeitos benéficos à saúde quando consumido em doses adequadas, diariamente. Os produtos fermentados disponíveis no mercado são muitas vezes restritos às matrizes lácteas e, portanto, a avaliação de leites vegetais como veículos para fermentação é uma alternativa emergente. O leite de coco consiste em um líquido extraído mecanicamente a partir do endosperma sólido do coco (*Cocos nucifera* L.) maduro e pode ser consumido na forma de bebida quando é misturado à água. O trabalho propôs o desenvolvimento e caracterização de bebidas funcionais utilizando leite de coco como substrato fermentativo de *L. reuteri* LR 92 ou DSM 17938. Os parâmetros ótimos para assegurar a viabilidade das linhagens foram: concentração de polpa de coco maduro em água 1:3 (m/v) e incubação a 37 °C para LR 92 e concentração 1:3 (m/v) e 34 °C para DSM 17938. O estudo do processo fermentativo mostrou que o leite de coco forneceu substrato adequado à multiplicação de *L. reuteri*, atingindo viabilidade superior a 8 log UFC/mL após 8 e 10 horas de fermentação por DSM 17938 e LR 92, respectivamente. Análises químicas indicaram que a sacarose contida naturalmente na matriz (4,4 mg/mL) foi o açúcar utilizado para multiplicação celular e as linhagens diferiram na produção e teor de ácidos orgânicos. Foram detectadas quantidades mínimas de reuterina (0,14 a 0,15 mM) produzidas por ambas as linhagens. *L. reuteri* DSM 17938 apresentou acentuada diminuição de pH e aumento de acidez (pós acidificação) ao final do armazenamento a 4 °C por 30 dias. A linhagem LR 92 apresentou baixa pós acidificação neste período e, por isso, foi escolhida para confecção de dois produtos: um à base de leite de coco fermentado (FC) e à base de leite de coco fermentado com adição de polpa de morango (FCM). A viabilidade inicial de aproximadamente 8 log UFC/mL diminuiu após armazenamento a 4 °C por 30 dias até $7,37 \pm 0,08$ log UFC/mL e $6,80 \pm 0,09$ log UFC/mL para FC e FCM, respectivamente. Após simulação gastrointestinal, a taxa de sobrevivência de *L. reuteri* encontrada para FC ($81,63 \pm 0,58$ %) foi maior que a para FCM ($74,17 \pm 1,65$ %). O produto FCM apresentou capacidade antioxidante por radical ABTS•+ e compostos fenólicos totais superior à FC devido à adição de polpa de morango. A análise sensorial mostrou que os produtos foram bem aceitos no teste de aceitação hedônica (total 9 pontos), com médias globais $7,54 \pm 1,37$ para FC e $7,74 \pm 1,16$ para FCM, e no teste de escala de atitude (total 7 pontos), com notas $5,10 \pm 1,28$ para FC e $5,48 \pm 1,30$ para FCM. Os produtos FC e FCM apresentaram resultados satisfatórios e promissores, indicando que as bebidas à base de leite de coco fermentado são adequadas ao desenvolvimento de novos produtos funcionais e podem ser uma alternativa para os consumidores em um mercado predominantemente ocupado por matrizes lácteas.

Palavras chave: Análise sensorial. *Lactobacillus reuteri*. Leite vegetal. Shelf-life. Simulação gastrointestinal.

MAURO, Carolina Saori Ishii. **Development of a fermented coconut milk based beverage**. 112 p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The microorganism *Lactobacillus reuteri* is able to improve the intestinal microbial balance and produce beneficial effects when consumed in adequate doses, on a daily basis. Fermented products available on the market are often restricted to dairy matrices, and therefore the evaluation of vegetable milks as vehicles for fermentation is an emerging alternative. Coconut milk consists of a liquid extracted mechanically from the mature solid endosperm of coconut (*Cocos nucifera* L.) and can be consumed as a beverage when it is mixed with water. The objective of this work was to develop and characterize functional beverages using coconut milk as a fermentative substrate of *L. reuteri* LR 92 or DSM 17938. The optimal parameters to ensure the viability of the strains were: concentration of mature coconut pulp in water 1: 3 (w/v) and incubation at 37 °C for LR 92 and concentration 1:3 (w/v) and 34 °C for DSM 17938. The fermentative process study showed that coconut milk provided adequate substrate for the growth of *L. reuteri* without the need for supplementation, reaching viability higher than 8 log CFU/mL after 8 and 10 hours of fermentation by DSM 17938 and LR92, respectively. Chemical analysis indicated that the naturally occurring sucrose in the matrix (4.4 mg/mL) was the sugar used for cell multiplication and the strains differed in the production and content of organic acids. Minimal amounts of reuterin (0.14 to 0.15 mM) produced by both strains were detected. *L. reuteri* DSM 17938 presented a great decrease of pH and increase of acidity (post acidification) during refrigerated storage at 4 °C for 30 days. The LR 92 strain showed low post acidification and was therefore chosen to produce two products: one based on fermented coconut milk (FC) and another based on fermented coconut milk with the addition of strawberry pulp (FCM). The initial viability of approximately 8 log CFU/mL decreased after refrigerated storage up to 7.37 ± 0.08 log CFU/mL and 6.80 ± 0.09 log CFU/mL for FC and FCM, respectively. After gastrointestinal simulation, the survival rate of *L. reuteri* for FC (81.63 ± 0.58 %) was higher than that for FCM (74.17 ± 1.65 %). The product FCM presented antioxidant capacity by radical ABTS • + and total phenolic compounds superior to FC due to the addition of strawberry pulp. The sensorial analysis showed that the products were well accepted in the hedonic acceptance test (total 9 points), with a global score of 7.54 ± 1.37 for FC and 7.74 ± 1.16 for FCM, and in the scale test of attitude (total 7 points), with scores 5.10 ± 1.28 for FC and 5.48 ± 1.30 for FCM. The FC and FCM products presented satisfactory and promising results, indicating that the fermented coconut milk based beverages are suitable for the development of new functional products and may be an alternative for consumers in a market predominantly occupied by dairy matrices.

Keywords: *Lactobacillus reuteri*. Gastrointestinal simulation. Plant-based milk. Sensorial analysis. Shelf-life.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Via da fosfoquetolase utilizada por bactérias heterofermentativas.....25
- Figura 2** – Via de síntese da reuterina27
- Figura 3** – Palmeira de *Cocos nucifera* L. com frutos.....32
- Figura 4** – Dados globais de alimentos que substituem produtos de origem animal quanto à venda (\$) e crescimento em relação ao ano anterior (%), no período de 52 semanas (término em 12 de agosto de 2017)31
- Figura 5** – Estrutura molecular da goma guar36
- Figura 6** – Estrutura molecular da goma xantana.....37

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Gráficos de superfície de resposta 3 D e curvas de contorno em função da temperatura e concentração de polpa de coco para a contagem de células viáveis de *L. reuteri* LR 92 (a) e *L. reuteri* DSM 17938 (b).....55
- Figura 2** – Processo fermentativo de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 a 34 °C e *Lactobacillus reuteri* LR 92 a 37 °C em leite de coco 1:3 (m/v) durante 48 horas57
- Figura 3** – Valores de pH durante o processo fermentativo de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 a 34 °C e *Lactobacillus reuteri* LR 92 a 37 °C em leite de coco 1:3 (m/v) durante 48 horas.....59
- Figura 4** – Metabolização de açúcares por *L. reuteri* DSM 17938 (a) 34 °C e LR 92 (b) a 37 °C em leite de coco 1:3 (m/v) durante 48 horas60
- Figura 5** – Produção de ácidos orgânicos por *L. reuteri* DSM 17938 (a) e LR 92 (b) durante fermentação de 48 horas61

CAPÍTULO 3

- Figura 1** – Contagem de células viáveis de *L. reuteri* LR 92 em produto à base de leite de coco fermentado (FC) e produto à base de leite de coco fermentado com adição de polpa de morango (FCM) durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C.....84
- Figura 2** – Sobrevivência de *L. reuteri* LR 92 (log UFC/mL) em produtos à base de leite de coco fermentado (dia 1) durante exposição a condições *in vitro* de fase gástrica (2 h) e fase entérica I e II (4 e 6 h).....89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Composição centesimal de leite de coco comercial brasileiro por 100 gramas de parte comestível.....	34
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Delineamento Composto Central de Face Centrada (DCCFC) para fermentação de <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e <i>Lactobacillus reuteri</i> LR92 e variável resposta	53
Tabela 2 – ANOVA de células viáveis de <i>L. reuteri</i> DSM 17938 e <i>L. reuteri</i> LR 92 em leite de coco	54
Tabela 3 – Valor de pH, acidez titulável e contagem de células viáveis de <i>L. reuteri</i> linhagens DSM 17938 e LR 92 em leite de coco fermentado durante 0, 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C.....	63

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Composição dos produtos fermentados sabor coco e sabor coco com morango em 100 mL de produto	73
Tabela 2 – Formulações utilizadas no teste de adição de goma xantana e goma guar à formulação base, com total de 0,2% de gomas.....	78
Tabela 3 – Composição centesimal de leite de coco (LC), produto à base de leite de coco fermentado (FC) e produto à base de leite de coco fermentado com adição de polpa de morango (FCM)	79
Tabela 4 – Valor de pH, viscosidade, açúcares e ácidos orgânicos de produtos à base de leite de coco fermentado durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4°C.....	82
Tabela 5 – Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de leite de coco (LC) e produtos à base de leite de coco fermentado (FC e FCM) durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4°C	86
Tabela 6 – Valores L*, a* e b* de produtos à base de leite de coco fermentado por <i>L. reuteri</i> LR 92 durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4°C	88
Tabela 7 – Avaliação dos atributos sensoriais por escala hedônica e escala de atitude de produtos fermentados à base de leite de coco	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-HPA	3-hidroxiopropionaldeído
a*	Componente vermelho-verde
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Acidez Titulável
ATP	Adenosina Trifosfato
b*	Componente amarelo-azul
BAL	Bactérias Ácido-Láticas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCCFC	Delineamento Composto Central de Face Centrada
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FC	Produto à base de leite de coco fermentado
FCM	Produto à base de leite de coco fermentado com adição de polpa de morango
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFT	Institute of Food Technologists (Instituto de Tecnólogos de Alimentos)
L*	Luminosidade
LC	Leite de coco
LSPA	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
Meio MRS	Meio seletivo para <i>Lactobacillus</i> spp. de Man, Rogosa e Sharpe
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
p	Nível de significância
PVDF	Polyvinylidene difluoride (Fluoreto de polivinilideno)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UFC	Unidades formadoras de colônia
SI	Sistema Internacional de Unidades
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1	Introdução Geral	16
2	Objetivos	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	Referências	19
CAPÍTULO 1	Revisão Bibliográfica	22
1.1	PROBIÓTICOS	22
1.2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	24
1.2.1	Reuterina	26
1.2.2	BENEFÍCIOS CLÍNICOS DE <i>Lactobacillus reuteri</i>	28
1.3	LEITES VEGETAIS	30
1.4	COCO (<i>Cocos nucifera</i> L.)	32
1.5	LEITE DE COCO	33
1.6	GOMA GUAR.....	35
1.7	GOMA XANTANA	37
2	Referências	39
CAPÍTULO 2	Otimização da fermentação de bebida à base de leite de coco por <i>Lactobacillus reuteri</i>	45
	Resumo	45
1	Introdução	46
2	Material e Métodos	47
2.1	Leite de Coco	47
2.2	MICROORGANISMOS E DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS	48
2.2.1	Microrganismos	48

2.2.2	Determinações Microbiológicas	48
2.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
2.4	ESTUDO DA PROCESSO FERMENTATIVO	50
2.5	DETERMINAÇÃO DO PH E ACIDEZ TITULÁVEL (AT).....	50
2.6	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CLAE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA)	50
2.6.1	Preparo das amostras	50
2.6.2	Determinação de Açúcares e Ácidos orgânicos	51
2.7	DETERMINAÇÃO DA REUTERINA.....	51
2.8	ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO	52
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
3	Resultados e Discussão	52
3.1	OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO POR DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL DE FACE CENTRADA.....	52
3.2	ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO	56
3.2.1	Viabilidade de <i>L. reuteri</i>	56
3.2.2	pH.....	58
3.2.3	Determinação de açúcares.....	59
3.2.4	Determinação de ácidos orgânicos.....	61
3.3	ESTABILIDADE DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO	62
3.4	ANÁLISE DE REUTERINA.....	64
4	Conclusão	65
5	Referências	65
CAPÍTULO 3	Produto funcional à base de leite de coco fermentado com e sem adição de polpa de morango.....	69
	Resumo	69
1	Introdução	70

2	Material e Métodos	71
2.1	MICROORGANISMO E DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS	71
2.1.1	Microrganismo <i>L. reuteri</i> LR 92.....	71
2.1.2	Determinações microbiológicas.....	71
2.2	LEITE DE COCO FERMENTADO.....	71
2.3	TESTE DE ADIÇÃO DE GOMAS.....	72
2.3	Viscosidade	72
2.3	Sinérese	72
2.4	PREPARO DOS PRODUTOS FERMENTADOS	73
2.5	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DETERMINAÇÃO DO PH	74
2.6	ANÁLISE DOS PRODUTOS DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	74
2.6.1	Determinação de Açúcares e Ácidos Orgânicos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)	74
2.6.1.1	Preparo das amostras	74
2.6.1.2	Determinação de Açúcares e Ácidos orgânicos	75
2.6.2	Análise de Cor	75
2.6.3	Determinação de Compostos Fenólicos Totais e da Capacidade Antioxidante	75
2.6.4	Determinação de fungos e coliformes totais.....	76
2.7	SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL.....	76
2.8	ANÁLISE SENSORIAL.....	77
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
3	Resultados e Discussão	78
3.1	TESTE DE ADIÇÃO DE GOMAS.....	78
3.2	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	79
3.3	ANÁLISES DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	80
3.3.1	pH.....	80
3.3.2	Açúcares e ácidos orgânicos	81
3.3.3	Viscosidade	83
3.3.4	Viabilidade de <i>L. reuteri</i> LR 92	83
3.3.5	Compostos Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante.....	85
3.3.6	Cor.....	87
3.4	SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL.....	88

3.5	ANÁLISE SENSORIAL.....	91
4	Conclusão	92
5	Referências	93
	Conclusão Geral	98

APÊNDICE

APÊNDICE A –	Amostras FC e FCM servidas na análise sensorial de escala hedônica de aceitação e escala de atitude ou intenção	100
---------------------	---	-----

ANEXOS

ANEXO A –	Bula do medicamento Provance (Aché – Biogaia)	102
ANEXO B –	Boletim de análise da goma xantana (fabricante Xinjiang Fufeng Biotechnologies Co. Ltd, China).....	103
ANEXO C –	Boletim de análise da goma guar (fabricante Durga Enterprises, India)	104
ANEXO D –	Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Londrina.....	105
ANEXO E –	Termo de consentimento livre e esclarecido para os provadores do produto probiótico à base de leite de coco	109
ANEXO F –	Questionário sobre coleta de dados do provador.....	110
ANEXO G –	Ficha utilizada para avaliar a aceitação sensorial do leite de coco fermentado	111
ANEXO H –	Ficha utilizada para avaliar a aceitação por escala de atitude do leite de coco fermentado	112

1 Introdução Geral

Os microrganismos probióticos podem atuar na promoção e manutenção de saúde dos consumidores devido aos efeitos benéficos que eles proporcionam no organismo. Os efeitos são atribuídos a mecanismos de ação comuns a esta classe, como a modificação do pH por produção de ácidos, resistência à colonização, regulação do trânsito intestinal, normalização de disbiose e exclusão competitiva de patógenos (HILL et al., 2014).

Tendo em vista a crescente popularização do consumo de probióticos, diversas espécies são estudadas visando a manutenção da saúde e tratamento de doenças. Nesse contexto, *Lactobacillus reuteri* tem demonstrado segurança e eficácia no tratamento de cólicas infantis, diarreias infecciosas agudas, normalização da microbiota humana, combate de microrganismos patogênicos, atenuação de gengivite em idosos e até redução do colesterol total em indivíduos com hipercolesterolemia (MI et al., 2015; DINLEYICI et al., 2015; WALSHAM et al., 2016; KRAFT-BODI et al., 2015; JONES, 2012).

O *L. reuteri* secreta uma substância antimicrobiana denominada reuterina quando incubado em meios que contém quantidades excessivas de glicerol, em condições anaeróbias *in vitro* (LANGA et al., 2013) Como o glicerol ocorre naturalmente nas fezes, a capacidade de produzir reuterina é uma resposta evolutiva adaptativa que provavelmente contribui para as propriedades probióticas de *L. reuteri* (MORITA et al., 2008).

Em alimentos fermentados, além das formulações contendo leite como meio de crescimento, há estudos que demonstram resultados promissores na fermentação de matrizes não lácteas, como sucos de frutas, vegetais, cereais e legumes (PANGHAL et al., 2018). Tais resultados mostram que na indústria alimentícia, os probióticos possuem potencial para desenvolvimento de novos produtos funcionais.

O leite de coco consiste em um líquido extraído mecanicamente a partir do endosperma do coco (*Cocos nucifera*) maduro (DE LEON; DELORES, 2004). O conteúdo de minerais, vitaminas, proteínas e lipídeos faz do leite de coco um alimento com propriedades nutricionais únicas (SANTOS; LIBECK; SCHWAN, 2014; BELEWU; BELEWU, 2007). Este leite vegetal pode ser consumido na forma de

bebida quando a polpa de coco maduro é misturada à água, resultando em uma suspensão vegetal de cor semelhante ao leite (MÄKINEN et al., 2015).

O leite de coco é uma emulsão óleo em água instável. Por isso, na indústria, emulsificantes, estabilizantes e espessantes são adicionados para melhorar a estabilidade e características sensoriais do produto final (TANGSUPHOOM; COUPLAND, 2009). As gomas têm a habilidade de controlar as características reológicas de sistemas aquosos para manter aparência homogênea dos produtos (DZIEZAK, 1991). Na indústria alimentícia, a goma guar é utilizada em bebidas como espessante, atua no controle de viscosidade e prolongamento da vida de prateleira (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2014). A goma xantana aplicada em bebidas varia na proporção 0,05 a 0,2% (m/v), e atua como agente de corpo, mantém em suspensão as partículas de polpa de frutas e promove boa aparência e textura do produto (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017).

O desenvolvimento de bebidas probióticas não lácteas representa um grande desafio à pesquisa porque envolve a escolha da matriz adequada para o crescimento do microrganismo, manutenção de células viáveis durante o armazenamento e processamento tecnológico para assegurar a qualidade, segurança e aceitação do produto final (SHORI, 2016).

Devido à importância em se fornecer produtos voltados a consumidores com restrição quanto ao consumo de lactose ou que não apreciam alimentos de origem animal, vegetarianos e veganos, o presente trabalho aborda o desenvolvimento de produtos à base de leite de coco fermentado pelas linhagens de *Lactobacillus reuteri* LR 92 ou *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

2 Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar bebida fermentada por *Lactobacillus reuteri* LR92 ou *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 à base de leite de coco com e sem adição de polpa de morango para uso como produtos funcionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as melhores condições para crescimento de *L. reuteri* LR 92 e *L. reuteri* DSM 17938;
- Monitorar o processo fermentativo quanto à viabilidade dos microrganismos, pH, açúcares e ácidos orgânicos durante 48 horas;
- Determinar a produção de reuterina nos fermentados;
- Elaborar bebidas com e sem polpa de morango;
- Testar concentrações de goma guar e goma xantava para promover estabilidade da bebida;
- Caracterizar as bebidas quanto à composição centesimal;
- Avaliar a sobrevivência de *L. reuteri*, a viscosidade, cor, pH, açúcares e ácidos orgânicos dos produtos durante o armazenamento a 4°C por 30 dias;
- Avaliar a sobrevivência de *L. reuteri* durante simulação gastrointestinal;
- Analisar a viscosidade e capacidade antioxidante dos produtos;
- Realizar um teste sensorial de aceitação dos produtos.

3 Referências

- BELEWU, M.A.; BELEWU, K.Y. Comparative Physico-Chemical Evaluation of Tiger-nut Soybean and Coconut Milk Sources. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.9, n.5, 2007.
- DE LEON, S. Y.; DELORES, M. I. 'Coconut', in Barrett D M , Somogyi L and Ramaswamy, H. S. **Processing Fruits: Science and Technology** , Second Edition , CRC Press , Florida , p. 707 – 737, 2004.
- DINLEYICI, E. C.; DALGIC, N.; GUVEN, S.; METIN, O.; YASA, O.; KURUGOL, Z.; TUREL, O.; TANIR, G.; YAZAR, A. S.; ARICA, V.; SANCAR, M.; KARBUZ, A.; EREN, M.; OZEN, M.; KARA, A.; VANDENPLAS, Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 91, p. 392-396, 2015.
- DZIEZAK, J.D. A focus on gums. **Food Technology**, v. 45, n.3, p. 117-132, 1991.
- HABIBI, H.; KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 130-140, 2017.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.
- JONES, M. L.; MARTONI, C. J.; PARENT, M.; PRAKASH, S. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. **British Journal of Nutrition**, v. 9, p. 1–9, 2012.
- KRAFT-BODI E.; JØRGENSEN M. R.; KELLER M. K.; KRAGELUND C.; TWETMAN S. Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly. **Journal of Dental Research**, v. 94(9 Suppl), 2015.
- LANGA, S.; LANDETE, J. M.; MARTÍN-CABREJAS, I.; RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; MEDINA, M. *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products, **Food Control** v. 33 p. 1-5, 2013.
- MÄKINEN, O. E.; UNIACKE-LOWE T.; O'MAHONY J. A.; ARENDT, E. K. Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. **Food Chemistry**, v. 168, p. 630–638, 2015.
- MI, G. E.; ZHAO, L.; QIAO, D.; KANG, W.; TANG, M.; XU, J. Effectiveness of *Lactobacillus reuteri* in infantile colic and colicky induced maternal depression: a prospective single blind randomized trial. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, p.1547-1553, 2015.

MORITA, H.; TOH, H.; FUKUDA, S. et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. **DNA Research**, v. 15, p. 151-161, 2008.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: Processing, properties and food applications - A Review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 409–418, 2014.

PANGHAL, A.; JANGHU, S.; VIRKAR, K.; GAT, Y.; KUMAR, V.; CHHIKARA, N. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80–89, 2018.

SANTOS, C. C. A. A.; LIBECK, B. S.; SCHWAN, R. F. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 32–41, 2014.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1-8, 2016.

TANGSUPHOOM, N.; COUPLAND, J. N. Effect of thermal treatments on the properties of coconut milk emulsions prepared with surface-active stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1792-1800, 2009.

WALSHAM, A. D. S.; MACKENZIE, D. A.; COOK, V.; WEMYSS-HOLDEN, S.; HEWS, C. L.; JUGE, N.; SCHÜLLER, S.. *Lactobacillus reuteri* Inhibition of Enteropathogenic Escherichia coli Adherence to Human Intestinal Epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2016.

A dissertação será apresentada em três capítulos distintos, descritos abaixo, seguidos de uma conclusão geral e anexos:

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica: Probióticos; *Lactobacillus reuteri*; Reuterina; Benefícios clínicos de *Lactobacillus reuteri*; Leites vegetais; Coco (*Cocos nucifera* L.); Leite de coco; Goma guar; Goma xantana.

Capítulo 2 – Artigo: Otimização da fermentação de bebida à base de leite de coco por *Lactobacillus reuteri*.

Capítulo escrito conforme as normas da ABNT.

Capítulo 3 – Artigo: Produto funcional à base de leite de coco fermentado com e sem adição de polpa de morango.

Capítulo escrito conforme as normas da ABNT.

CAPÍTULO 1 Revisão Bibliográfica

1.1 PROBIÓTICOS

A história dos probióticos desenvolve-se em conjunto com a humanidade e pode ser rastreada até antiguidade, há quase 10 mil anos atrás. Antes mesmo da descoberta da existência de microrganismos, produtos fermentados como cerveja, pão, vinho, kefir, kumis (leite de égua fermentado) e queijo eram frequentemente utilizados para fins nutricionais, terapêuticos e de preservação dos alimentos (OZEN; DINLEYICI, 2015).

As bactérias produtoras de ácido láctico foram descobertas em 1857 por Louis Pasteur e desde então, pesquisadores do Instituto Pasteur desenvolveram pesquisas visando o isolamento dessas bactérias provenientes de leite rancificado e do trato gastrointestinal (NEUBAUER; MOLLET, 2002).

O primeiro cientista a abordar a ideia de que bactérias benéficas ao organismo poderiam atuar no tratamento de doenças intestinais foi Henry Tissier, um pediatra do Instituto Pasteur. Este cientista descobriu o gênero *Bifidobacterium* spp. em 1889, e reportou que estas bactérias poderiam curar a gastroenterite aguda, devido à normalização do desequilíbrio causado pelas bactérias nocivas (HOOVER. HUGHES, 1991). Em 1905, Stamen Grigorov identificou uma espécie de *Lactobacillus* em cultura starter de iogurte búlgaro e propôs que o iogurte fosse a razão pela qual as pessoas que o consumiam vivessem mais tempo. Poucos anos depois, em 1907, o microbiologista russo Elie Metchnikoff publicou um estudo associando a ingestão de leite fermentado e longevidade, com base em observações de aldeões da Bulgária. A bactéria fermentadora foi chamada *Lactobacillus bulgaricum*, em reconhecimento a Grigorov (OZEN; DINLEYICI, 2015).

Em 1930, o cientista japonês Minoru Shirota isolou *Lactobacillus* provenientes de intestino humano que demonstraram inibição de patógenos e sobrevivência ao trato gastrointestinal. Um produto lácteo fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota foi criado e comercializado no Japão a partir do ano de 1935. Hoje, com mais de 80 anos de história, o Yakult é vendido em 38 países e popularizou o consumo dos probióticos mundialmente (YAKULT, 2018).

De acordo com a FAO/WHO (2002), probióticos são “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades indicadas conferem benefício à saúde do

hospedeiro”. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define probióticos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Os probióticos podem ser bactérias, bolores ou leveduras, sendo as bactérias ácido-lácticas (BAL) a sua grande maioria. As BAL são utilizadas como fermentadoras de diversos produtos, como leite de vaca, sucos de frutas, sucos de vegetais e leites vegetais (OYETAYO; OYETAYO, 2005; PERRICONE et al., 2014; BERNAT et al., 2014). No entanto, os produtos fermentados disponíveis no comércio são majoritariamente compostos por matrizes lácteas, principalmente devido à origem histórica e descoberta das BAL como preservadoras de leite de vaca (OYETAYO; OYETAYO, 2005; OZEN; DINLEYCI, 2015).

Peritos científicos realizaram uma conferência para discutir a definição de probióticos da FAO/WHO (2001), com o objetivo de desenvolver uma opinião atualizada e consensual sobre estes microrganismos. Hill et al. (2014) concordaram que deveriam ser definidas como probióticas as espécies microbianas que têm demonstrado benefícios à saúde em estudos rigidamente controlados. Sendo assim, qualquer alegação específica de “contém probióticos” deve ser fundamentada, excluindo os microrganismos para os quais não há nenhuma evidência de benefício à saúde. Com isso, linhagens provenientes de amostras humanas podem ser consideradas probióticas se existirem provas suficientes de segurança e eficácia.

Segundo a legislação brasileira, a alegação de propriedade funcional ou de saúde dos produtos probióticos é avaliada com base nas definições e princípios estabelecidos na Resolução n. 18/1999 (BRASIL, 1999). Para isso, deve haver comprovação da segurança e eficácia do uso. Devem ser apresentadas, no mínimo, as seguintes informações (BRASIL, 2016):

1. Caracterização do microrganismo
2. Perfil de resistência a antimicrobianos e informações sobre a base genética da resistência antimicrobiana.
3. Determinação da atividade hemolítica para espécies com potencial hemolítico.
4. Estudos disponíveis na literatura que descrevam efeitos adversos observados com a cepa em questão.
5. Demonstração de eficácia.
6. Viabilidade.

Os mecanismos de promoção de saúde comuns aos probióticos envolvem a modificação do pH por produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta, resistência à colonização, regulação do trânsito intestinal, normalização da disbiose, maior renovação de enterócitos (“turnover”) e a exclusão competitiva de patógenos (HILL et al., 2014).

Algumas linhagens do microrganismo *Lactobacillus reuteri* são utilizadas como probióticos. Esta bactéria tem amplo espectro de segurança e seu uso é indicado para pessoas de todas as faixas etárias (principalmente crianças e lactentes) devido aos benefícios que o *Lactobacillus reuteri* pode fornecer (item 1.2.1).

1.2 *Lactobacillus reuteri*

O *Lactobacillus reuteri* é uma bactéria Gram positiva, imóvel que não forma esporos. Esta bactéria é anaeróbia facultativa, normalmente cultivada em condições de oxigênio limitado, com crescimento ótimo observado em temperaturas entre 37 a 42 °C e pH em torno de 6,5 (SINKIEWICZ, 2010).

Essa espécie é denominada heterofermentativa, por isso, no processo fermentativo, há produção de dióxido de carbono, etanol, ácido láctico e acético decorrentes do consumo de carboidratos. A via utilizada é a via da fosfoquetolase, apresentada na Figura 1 (ÅRSKÖLD et al., 2008).

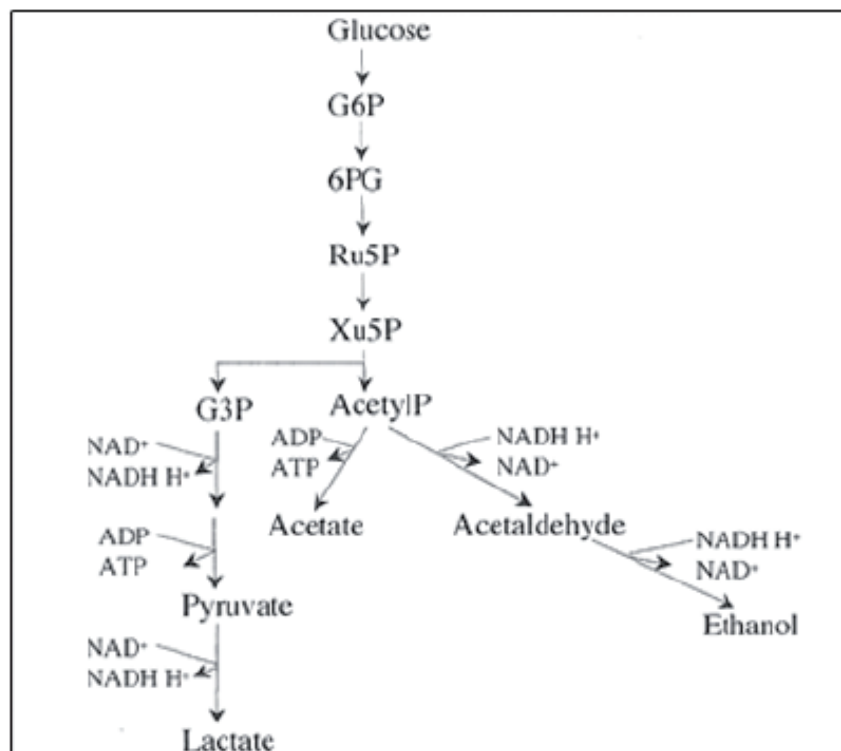
A maioria das BAL utilizam a via da fosfoquetolase para fermentar pentoses, porém, essa via tem um rendimento menor de energia quando comparado à via de Embden-Meyerhof (glicólise) utilizada na fermentação das bactérias homofermentativas. Essa desvantagem pode ser superada pela adição de aceptores de elétrons, que permitem *L. reuteri* ganhar um ATP da conversão de acetil fosfato em acetato, ao invés de sofrer redução para gerar NAD⁺ e produzir etanol. Dessa forma, o fornecimento externo de hidrogênio estimula as reações com produção de energia (ATP) e aumenta a taxa de crescimento do microrganismo (TALARICO et al., 1990).

As cepas de *L. reuteri* apresentam rápida multiplicação celular em meios com disponibilidade de açúcares fermentescíveis, aminoácidos, vitaminas e nucleotídeos. Isso acontece porque para fornecer energia adicional no seu crescimento, *L. reuteri*

pode utilizar vários aceptores de elétrons externos, como frutose, glicerol, nitrato, piruvato, citrato e oxigênio (GEREZ et al., 2008).

Contudo, *L. reuteri* ATCC 55730 demonstrou apresentar duas vias de degradação de glicose quando cultivado em meio contendo sacarose como fonte de carbono. A via principal utilizada foi a fosfoquetolase, enquanto que a glicólise foi usada como via alternativa, em proporções menores (ÅRSKÖLD et al., 2008).

Figura 1 – Via da fosfoquetolase utilizada por bactérias heterofermentativas



Fonte: Sinkievicz (2010)

Lactobacillus spp. residem no trato gastrointestinal de humanos e animais, principalmente no intestino delgado, região rica em mono, dissacarídeos e aminoácidos (KAMADA et al, 2013). O *L. reuteri* já foi isolado a partir de fezes humanas, leite materno, vagina humana, cavidade oral humana, preás, ratos, porcos, frangos e massa para panificação (HOU et al., 2015). Sendo assim, esta espécie é considerada autóctone, ou seja, residente da microbiota normal do corpo humano.

L. reuteri pode exercer proteção intestinal, impedindo o estabelecimento de microrganismos patogênicos nas infecções. Walsham et al. (2016) mostraram que *L.*

reuteri ATCC PTA 6475 e ATCC 53608 diminuíram a aderência *in vitro* de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) no epitélio intestinal através da exclusão competitiva. As linhagens do probiótico inibiram a dispersão das microcolônias (aglomeração de 5 ou mais colônias) e propagação celular de EPEC no muco e epitélio através bloqueio de receptores da superfície celular.

1.2.1 Reuterina

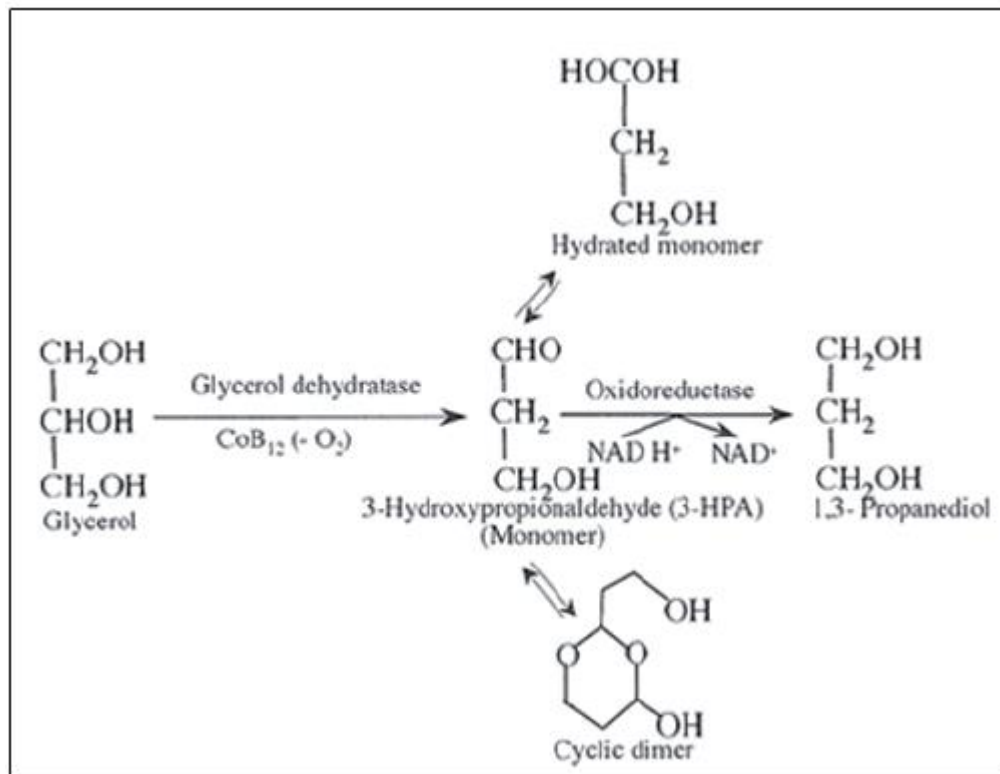
Alguns probióticos são capazes de produzir compostos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e peptídeos com propriedades bactericidas ou bacteriostáticas (JACK; TAGG; RAY, 1995).

O 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) é a substância antimicrobiana produzida pelo *L. reuteri*, denominada reuterina. Esta substância não é considerada uma bacteriocina principalmente devido à sua estrutura não consistir em um peptídeo sintetizado por ribossomos, além do fato de que o hospedeiro (*L. reuteri*) pode ser sensível às concentrações superiores a 50 mM (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004; CLEUSIX et al., 2007).

O *L. reuteri* secreta a reuterina *in vitro* quando incubado em meios que contém quantidades excessivas de glicerol, em condições anaeróbias (LANGA et al., 2013). A reuterina tem baixa massa molecular, é solúvel em água, estável em uma ampla faixa de pH e exibe atividade contra bactérias Gram negativas e Gram positivas, assim como leveduras, fungos filamentosos e protozoários (TALARICO; DOBROGZS, 1989).

Na Figura 2 está apresentada a conversão do glicerol em uma mistura de 3-HPA, que consiste no equilíbrio de formas monomérica, monomérica hidratada e dimérica cíclica (SINKIEVICZ, 2010). A inclusão de glicerol no meio de cultura com uma fonte utilizável de carbono e energia, como a glicose, resulta em maior taxa de crescimento e rendimento celular de *L. reuteri*. Isso acontece porque o glicerol atua como um aceptor externo de elétrons, pois o microrganismo o utiliza para regenerar NADH (TALARICO et al., 1990).

Figura 2 – Via de síntese da reuterina



Fonte: Sinkiewicz (2010)

Ortiz-Riveira et al. (2017) analisaram leite fermentado com produção de reuterina *in situ*, no qual esta substância demonstrou atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* ssp. *enterica*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Penicillium expansum* no alimento contaminado. Devido à essa característica, a reuterina é considerada um potencial antimicrobiano de amplo espectro de ação que pode ser utilizado na preservação de alimentos.

Cleusix et al. (2007) avaliaram a sensibilidade de bactérias intestinais à reuterina e observaram que a maioria das bactérias comensais testadas foram inibidas pela concentração de 7,5mM do antimicrobiano. Além disso, as cepas de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 e SD 2112 foram as mais resistentes, requerendo cerca de 50 mM de reuterina para inibição, o que sugere inibição apenas em quantidades elevadas do composto. Com isso, as linhagens de *L. reuteri* mantêm-se viáveis mesmo em concentrações elevadas de reuterina.

Algumas cepas de *L. reuteri* mostraram produzir folato (ácido fólico) e cobalamina (vitamina B12) na presença de glicerol. Isso acontece porque a enzima responsável pela formação de reuterina (3-HPA) é a coenzima glicerol desidratase

dependente de B12, responsável também pela produção de vitamina B12 pelo microrganismo (MORITA et al., 2008).

Santos et al. (2008) produziram ácido fólico e vitamina B12 através de fermentação de *L. reuteri* JCM1112 em sucos de fruta como melão e abóbora. Já Gu et al. (2015) produziram vitamina B12 após a fermentação de soja por *L. reuteri* ZJ03. Esta característica pode favorecer o desenvolvimento de alimentos fermentados direcionados às populações com deficiência destes micronutrientes, como idosos e vegetarianos estritos.

Como o glicerol está naturalmente presente nas fezes, a capacidade de produzir reuterina e cobalamina é uma resposta evolutiva adaptativa que provavelmente contribui para as propriedades probióticas de *L. reuteri* (MORITA et al., 2008).

1.2.2 BENEFÍCIOS CLÍNICOS DE *Lactobacillus reuteri*

O microrganismo *L. reuteri* é capaz de sobreviver no trato gastrointestinal de humanos e exercer seu efeito probiótico no organismo. Na clínica pediátrica, Mi et al. (2015) avaliaram a administração de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 em 42 crianças com idade inferior a 4 meses que apresentavam cólica infantil. A dose de probiótico administrada a 21 crianças foi uma formulação contendo 1×10^8 UFC e o outro grupo de 21 crianças recebeu o placebo (mesma formulação sem probióticos). O tratamento foi feito por 21 dias, com acompanhamento por 4 semanas. Resultados mostraram que o tratamento teve sucesso em 100% das crianças do grupo que ingeriu o probiótico e apenas em 15,7% do grupo placebo. O grupo probiótico teve choro significativamente reduzido a 32.1 ± 8.3 min/dia ($p < 0,01$). Sendo assim, o estudo sugere que o probiótico pode ser uma opção segura e eficaz para tratar a cólica infantil.

Em um outro estudo utilizando a mesma cepa, Dinleyici et al. (2015) conduziram dois ensaios clínicos randomizados controlados por placebo em 64 crianças com diarreia aguda, internadas em uma clínica ambulatorial. O probiótico *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 foi administrado com dose de 1×10^8 UFC/mL por cinco dias em um grupo de crianças, e o outro grupo recebeu somente soro via oral. A duração média da diarreia foi significativamente reduzida no grupo *L. reuteri* em comparação com o grupo de controle após 48 horas de tratamento, demonstrando

que o *L. reuteri* DSM 17938 é eficaz, seguro e bem tolerado pelas crianças, reduzindo a diarreia infecciosa aguda no cuidado pediátrico ambulatorial.

Já em adultos, Del Campo et al (2014) observaram melhora da saúde digestiva e redução da população de γ -proteobactérias na microbiota intestinal de pacientes com fibrose cística usando uma preparação contendo *L. reuteri* DSM 17938. As γ -proteobactérias são uma classe de bactérias que inclui *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Pseudomonadaceae*, gêneros que apresentam uma variedade de bactérias patogênicas. Neste estudo, observou-se que indivíduos portadores de fibrose cística apresentaram disbiose na microbiota intestinal, com predominância de proteobactérias patogênicas. Após 6 meses de administração, resultados mostraram que o consumo do probiótico diminuiu significativamente a inflamação intestinal e aumentou o conforto digestivo dos pacientes.

Por outro lado, um ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo envolveu 114 indivíduos com hipercolesterolemia com o objetivo de avaliar a eficácia de um iogurte contendo *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado na diminuição de colesterol. Após 6 semanas, os indivíduos que receberam o produto apresentaram significativa redução de LDL-colesterol (8,92%), colesterol total (4,81%) e colesterol não-HDL (6,01%), quando comparado ao placebo, mostrando que *L. reuteri* exerceu efeito positivo no perfil lipídico dos indivíduos (JONES, 2012).

Quando administrado em idosos, a bactéria probiótica também exerce efeitos benéficos. Um estudo duplo cego controlado por placebo investigou o efeito da ingestão diária de *L. reuteri* DSM 17938 e *L. reuteri* ATCC PTA 5289 sobre a prevalência e as contagens de *Candida* oral em pacientes idosos frágeis que vivem em lares de idosos. Fizeram parte do estudo 215 idosos (60 a 102 anos), divididos em um grupo que ingeriu as duas linhagens de probiótico e outro que recebeu apenas o placebo. Após 3 meses, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem de *Candida* e inflamação da gengiva no grupo que recebeu probióticos, comparada ao grupo placebo (KRAFT-BODI et al., 2015).

Tendo em vista as aplicações apresentadas, o *L. reuteri* pode ser empregado na manutenção e promoção de saúde como um probiótico eficaz, seguro, bem tolerado e com efeitos benéficos no organismo humano em diversas faixas etárias.

1.3 LEITES VEGETAIS

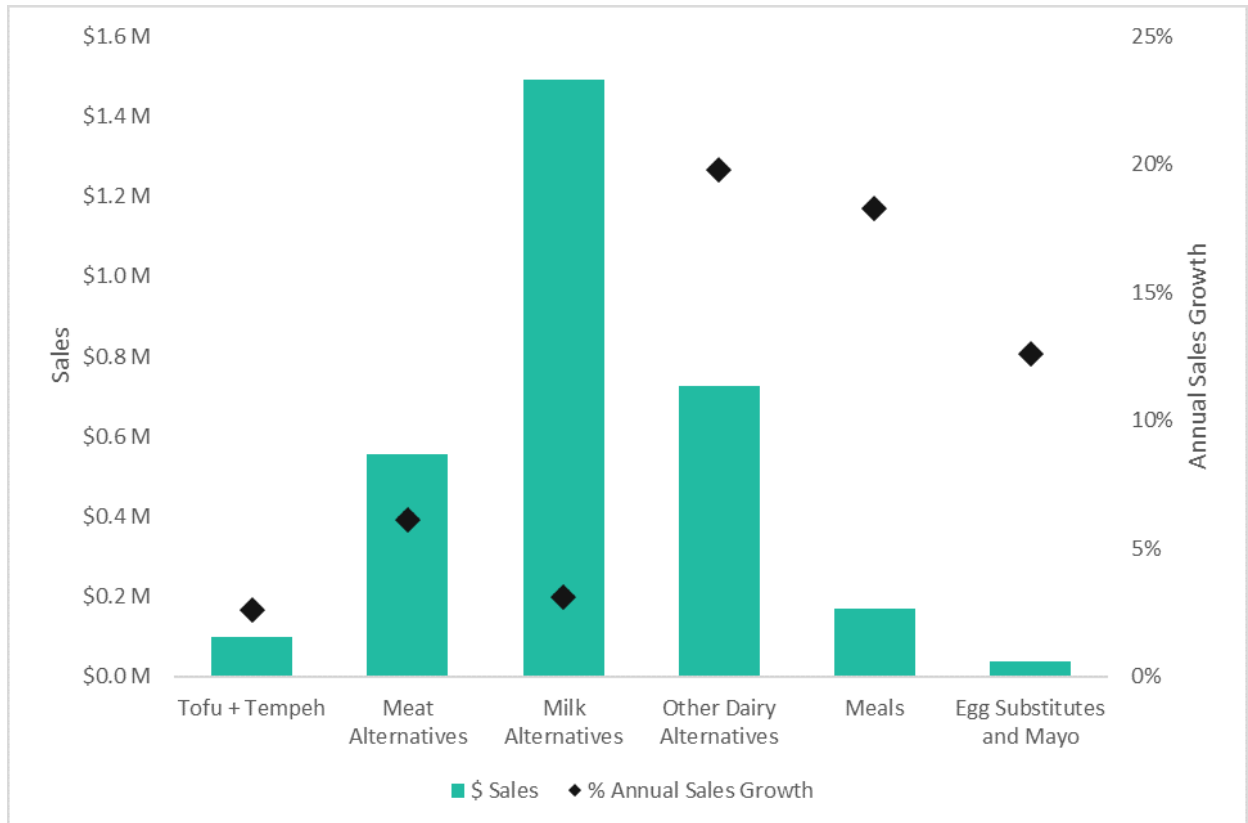
Os produtos de origem vegetal são uma tendência de mercado devido a vários fatores como: alergias e restrições alimentares, busca de estilo de vida mais saudável, diminuição no consumo de alimentos de origem animal e dietas vegetariana e vegana (MCCARTHY et al., 2017; IFT, 2015).

Os leites vegetais são obtidos através de extração de material vegetal adicionado à água, desintegração e filtração, resultando em um produto semelhante ao leite de vaca em aparência (MÄKINEN et al., 2015). Os leites vegetais são produzidos a partir de oleaginosas, cereais ou leguminosas, sendo os mais comuns à base de soja, amêndoa, arroz, coco e quinoa (IFT, 2015). Essas bebidas são feitas com grãos integrais ricos em fibras, minerais e proteínas, e por isso, podem oferecer benefícios nutricionais aos consumidores. Tais benefícios variam dependendo do tipo de planta utilizada, processamento tecnológico de obtenção e fortificação (MÄKINEN et al., 2015).

No ano de 2017, as vendas no varejo de alimentos à base de plantas destinados a substituir produtos animais totalizaram 3,1 bilhões de dólares nos Estados Unidos. Neste contexto, 9,3 % da venda total de leite foi composta por leites vegetais, com arrecadação de aproximadamente 1,5 bilhões de dólares (Figura 4). Além disso, o consumo de iogurte à base de leites vegetais mostrou crescimento de 56% em relação ao ano de 2016 (NIELSEN, 2017).

Estas bebidas não são substitutas dos produtos lácteos, pois diferem no teor de proteínas e outros nutrientes, porém podem oferecer alternativas ou complementos aos consumidores devido à presença de componentes funcionalmente ativos com propriedades promotoras de saúde (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016).

Figura 4 – Dados globais de alimentos que substituem produtos de origem animal quanto à venda (\$) e crescimento em relação ao ano anterior (%), no período de 52 semanas (término em 12 de agosto de 2017).



No Brasil, ainda não há pesquisa de mercado quanto às vendas de leites vegetais, porém, devido à notoriedade de venda deste produto no mundo todo, muitas marcas estão investindo neste setor. O desenvolvimento de produtos contendo leites vegetais é relativamente novo e com isso, pesquisas são necessárias para superar problemas de estabilidade, textura, nutrientes e sensoriais (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Os leites vegetais podem sofrer sinérese por constituir uma suspensão de material vegetal em água (MÄKINEN et al., 2015). Por isso, para garantir a estabilidade do produto final no mercado consumidor, faz-se necessária a homogeneização e adição de estabilizantes, emulsificantes e espessantes. Assim, os leites vegetais vêm sendo estudados quanto à adição de hidrocolóides para agregar características tecnológicas e garantir estabilização do produto (YADAV et al., 2010).

1.4 Coco (*Cocos nucifera* L.)

O coco (*Cocos nucifera* L.) é um fruto da palmeira que pertence à família *Arecaceae* (Figura 3). A classificação botânica da espécie é: classe *Monocotyledoneae*, ordem *Palmales*, família *Arecaceae*, subfamília *Cocoideae* e gênero *Cocos* (PURSEGLOVE, 1981). No Brasil, a palmeira também é denominada popularmente como coqueiro, coco-da-bahia ou coqueiro-da-praia (LORENZI et al., 2004).

Figura 3 – Palmeira de *Cocos nucifera* L. com frutos



Foto: Iria Hiromi Ishii

A espécie predominante no Brasil é considerada nativa da região nordeste por possuir uma característica distinta, a presença de três orifícios no endosperma. Essa característica é típica das palmeiras pertencentes à tribo *cocoideae* (LORENZI et al., 2004). Essa espécie naturalizada brasileira ocorre nas regiões norte (Pará), nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) e sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo), nos domínios geográficos da Amazônia e Mata Atlântica (LEITMAN et al., 2015).

As maiores plantações e produções de coco concentram-se na faixa litorânea do país. A produção é mais expressiva na região nordeste devido às condições climáticas do território, que detêm 71,6% da produção total do coco brasileiro (LSPA/IBGE, 2016).

Os países que mais produzem coco mundialmente são: Indonésia, Filipinas, Índia, Brasil e Sri Lanka, nesta ordem (SIRIPHANICH et al., 2011). O *Cocos nucifera* L. tem grande importância econômica em diversos países tropicais porque todas as suas partes podem ser aproveitadas (LORENZI et al., 2004). Do fruto pode-se extrair o óleo de coco, o leite de coco, água-de-coco, coco ralado, além dos produtos derivados da casca (mesocarpo), como tapetes, cordas e produtos têxteis (FOALE, 2003).

O coco é classificado como um alimento funcional altamente nutritivo. A polpa e a água-de-coco contêm minerais e nutrientes que são essenciais para a saúde humana (FERNANDO et al., 2015). A polpa do coco é rica em vitaminas, minerais e fibras alimentares, enquanto a água-de-coco constitui uma bebida isotônica rica em açúcares, potássio e vitaminas B e C, que auxiliam no tratamento de desidratação do organismo (YONG et al., 2009). O óleo de coco também teve seu uso difundido devido aos benefícios que ele pode oferecer. Há evidências de que o consumo de óleo de coco pode atuar na prevenção e tratamento de doença de Alzheimer, devido à presença de compostos fenólicos e fitohormônios (citocininas) responsáveis por influenciar na diferenciação e multiplicação celular (FERNANDO et al., 2015).

1.5 LEITE DE COCO

O leite de coco é obtido pela trituração mecânica ou manual da amêndoa do fruto maduro, com ou sem adição de água (DE LEON; DELORES, 2004). Segundo a legislação brasileira, “Produtos de Vegetais e Produtos de Frutas: devem ser designados por denominações consagradas pelo uso, seguida de expressão(ões) relativa(s) ao(s) ingrediente(s) que caracteriza(m) o produto. A designação pode ser seguida de expressões relativas ao processo de obtenção e ou forma de apresentação e ou característica específica” (BRASIL, 2005). Com isso, a denominação “leite de coco” está de acordo com a legislação vigente e pode ser utilizada para estes produtos.

Um método comum para estender a vida de prateleira do leite de coco é o processamento térmico, em que o produto é submetido ao aquecimento a 92 - 95 °C por 5 a 20 minutos (SIRIPHANICH et al., 2011). O leite de coco é uma emulsão óleo em água relativamente instável devido ao volumoso tamanho das gotículas e fracas propriedades emulsificantes das proteínas do coco na interface óleo-água. Sendo assim, emulsificantes, estabilizantes e espessantes são adicionados antes da homogeneização para melhorar a estabilidade e características sensoriais do produto final (TANGSUPHOOM; COUPLAND, 2009).

O leite de coco tem propriedades nutricionais importantes. A composição centesimal do leite de coco está apresentada na Tabela 1. A composição de minerais e micronutrientes do leite de coco em amostras comerciais brasileiras é: 5,8-131 mg.g⁻¹ de Cálcio, <0,27-1,56 mg.g⁻¹ de cobre, 0,76-5,52 mg.g⁻¹ de ferro, 212-1781 mg.g⁻¹ de potássio, 14,9-201 mg.g⁻¹ de magnésio, <0,11-3,88 mg.g⁻¹ de manganês, 274-625 mg.g⁻¹ de sódio, 26-341 mg.g⁻¹ de fósforo e <0,74-3,2 mg.g⁻¹ de zinco (SANTOS; LIBECK; SCHWAN, 2014).

A composição de ácidos graxos no leite de coco consiste em ácido láurico (56,23%), mirístico (18,30%), palmítico (8,95%) e cáprico (8,90%) oléico (7,30%) e linoléico (1,60%). A alta concentração de láurico e oléico pode auxiliar na prevenção de aterosclerose e doenças coronarianas (BELEWU; BELEWU, 2007).

Tabela 1 – Composição centesimal de leite de coco comercial brasileiro por 100 gramas de parte comestível

Componentes	Conteúdo
Umidade (%)	78,0
Energia (kcal)	166
Proteína (g)	1,0
Lipídeos (g)	18,4
Colesterol (mg)	NA
Carboidratos (g)	2,2
Fibra Alimentar (g)	0,7
Cinzas (g)	0,4
Cálcio (mg)	6
Magnésio (mg)	17

Fonte: TACO (2011)

A composição centesimal mostra que o leite de coco é rico em lipídeos e com isso, questiona-se o fato do produto fornecer riscos à saúde dos consumidores. Frente a este problema, Chukwunonso, Obioma e Ifeoma (2010) mostraram que o

consumo de leite de coco não aumentou o risco de doenças cardiovasculares em camundongos. Em um estudo envolvendo humanos, Ekanayaka et al. (2013) avaliaram o impacto de um suplemento dietético tradicional contendo leite de coco sobre o perfil lipídico de indivíduos saudáveis. Após 8 semanas, os pesquisadores concluíram que a gordura de coco sob a forma de leite de coco não causou efeito prejudicial sobre o perfil lipídico da população e que, na verdade, o efeito mostrou-se benéfico devido à capacidade de diminuir níveis de LDL colesterol e aumentar o HDL colesterol.

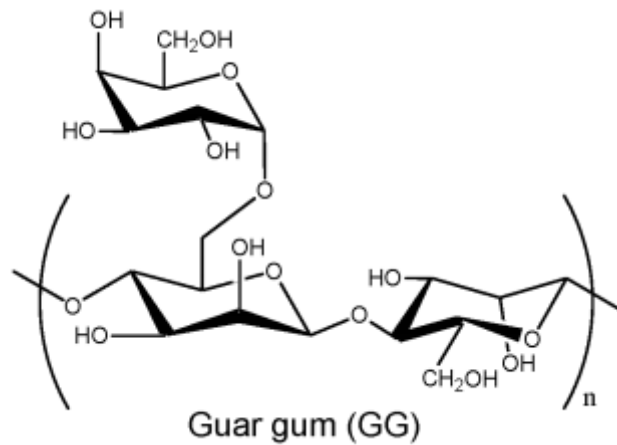
O leite de coco pode ser consumido por crianças com necessidades especiais, como intolerâncias e alergias ao leite. Carvalho e Coelho (2009) avaliaram sensorialmente produtos contendo leite de coco e extrato de soja para preparados infantis. Duas formulações foram desenvolvidas a partir da mistura dos ingredientes sólidos (aroma, açúcar, maltodextrina e extrato de soja) e dos líquidos (leite de coco e água mineral) e o índice de aceitação foi obtido para 35 provadores, de 3 a 4 anos. De um total de 7 pontos de escala hedônica facial, a média global dos produtos foi 5,85 para a formulação 1 (27% soja e 27% coco) e 5,23 para a formulação 2 (17% soja e 37% coco). Os resultados indicam que o desenvolvimento de novos produtos contendo leites vegetais é promissor, devido à aceitação global das crianças.

1.6 GOMA GUAR

As gomas têm a habilidade de controlar as características reológicas de sistemas aquosos por meio de estabilização de emulsões, suspensão de partículas, controle de cristalização de açúcares, inibição de sinérese, entre outros, mantendo assim a aparência homogênea dos produtos (DZIEZAK, 1991).

A goma guar é um polissacarídeo retirado do endosperma das sementes da espécie leguminosa *Cyamopsis tetragonoloba* (PRASAD et al., 2009). O seu principal componente é uma galactomanana, que consiste em uma cadeia principal de unidades de β -D-manopiranosil unidas por ligações (1 \rightarrow 4) a ramificações de uma única unidade de α -D-galactopiranosil, ligadas na posição O-6 (Figura 5). O polissacarídeo específico que compõe a goma guar é a guarana, na qual cerca de metade das unidades de D-manopiranosil da cadeia principal contém uma unidade α -D-galactopiranosil (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Figura 5 – Estrutura molecular da goma guar



Fonte: Prasad et al. (2009)

A goma guar apresenta características espessantes e estabilizantes. A grande maioria dos estabilizantes é formada por polissacarídeos ou, ainda, por proteínas. A goma guar forma soluções viscosas devido à sua alta massa molar e presença de interações intermoleculares, através de ligações de hidrogênio. Sendo assim, esta goma pode ser empregada em bebidas como estabilizante ou em sorvetes, pudins e coberturas para saladas, como espessante. A estabilização da formação de espuma, em vários produtos, também é um efeito deste aditivo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2015).

Devido ao poder de dispersão tanto em soluções quentes como frias, resultando em soluções viscosas sem formação de gel, a goma guar tem sido amplamente empregada na indústria de alimentos. As soluções de goma guar são estáveis numa faixa de pH entre 4,0 e 10,5, sendo a hidratação mais rápida em pH 8,0. As soluções de goma guar são geralmente turvas, devido à quantidade de fibras insolúveis e material celulósico presente (MARK et al., 1980).

Na maioria dos alimentos, a concentração de goma guar recomendada é inferior a 1%. Em concentrações inferiores a 0,5%, as soluções de goma guar se comportam como um sistema newtoniano, cuja viscosidade é constante em diferentes taxas de cisalhamento e não varia com o tempo (tensão proporcional à taxa de deformação). Acima da concentração de 0,5%, as soluções de goma guar se comportam como sistemas não-newtonianos e tixotrópicos, ou seja, a tensão de cisalhamento não é diretamente proporcional à taxa de deformação, e as soluções

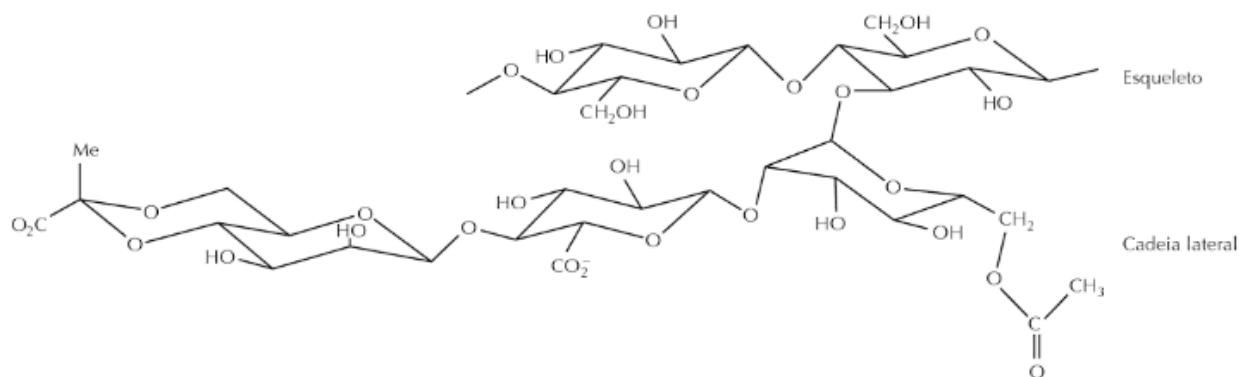
tem viscosidade menor quando são agitadas (SRICHAMROEN, 2007; MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2014).

Na indústria alimentícia, a goma guar tem ampla aplicação em sorvetes, molhos, bebidas, panificação e carnes. Devido às suas propriedades, em bebidas esta goma é utilizada como espessante, atua no controle de viscosidade e prolongamento da vida de prateleira (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2014).

1.7 GOMA XANTANA

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*. A sua estrutura (Figura 6) é constituída por uma cadeia principal de unidades de D-glicose unidas entre si por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ com resíduos alternados de D-manose e ácido D-glicurônico, na proporção molar de 2:1, formando a cadeia lateral (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004).

Figura 6 – Estrutura molecular da goma xantana



Fonte: Fennema, Damodaran e Parkin (2010)

A goma xantana apresenta-se estável em uma faixa de pH entre 1 a 13, a cisalhamento prolongado e temperaturas elevadas. As soluções de goma xantana são pseudoplásticas, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação do fluido. Esta característica é importante para liberação do sabor, sensação bucal e estética do produto. A goma xantana atua como espessante, estabilizante e, em associação com outras gomas, proporciona textura lisa e cremosa a alimentos líquidos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2015). A legislação

dos Estados Unidos (FDA) autoriza o uso de goma xantana como um aditivo alimentar estabilizante, emulsificante, espessante e agente de suspensão sem restrições, por se tratar de uma substância reconhecida como segura (FDA, 2014).

A proporção de goma xantana aplicada em produtos lácteos varia entre 0,05 a 0,2%, e esta goma é utilizada para fornecer viscosidade e estabilidade a longo prazo, melhorar a transferência de calor durante o processamento térmico, proteção contra choque térmico e controle da formação de cristais de gelo em sorvetes. Pode-se misturar a goma xantana às gomas carragena, guar (galactomananas) para potencializar os efeitos dos aditivos. Já em bebidas, esta goma pode ser usada na mesma proporção (0,05 a 0,2%) e atua como agente de corpo, mantém em suspensão as partículas de polpa de frutas e promove boa aparência e textura do produto (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017).

A goma xantana interage com a goma guar de forma sinérgica, formando uma solução viscosa que pode auxiliar nas propriedades de textura dos produtos alimentícios, deixando-a livre de defeitos de consistência e sinérese (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; EL-SAYED et al., 2002). Sendo assim, a combinação destas gomas pode exercer influência no processo de estabilização de produtos em função da formação de uma rede polimérica entre as moléculas de polissacarídeo (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

2. Referências

- ÅRSKÖLD, E.; LOHMEIER-VOGEL, E.; CAO, R.; ROOS, S.; RÅDSTRÖM, P.; VAN NIEL, E. W. J. Phosphoketolase Pathway Dominates in *Lactobacillus reuteri* ACC 55730 Containing Dual Pathways for Glycolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 190(1), p. 206-212, 2008.
- BERNAT, N.; CHAFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTINEZ C. Vegetable milks and their fermented derivative products. **International Journal of Food Studies**, v. 3, n. April, p. 93–124, 2014.
- BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 mai. 1999. Seção 1, p.11. 1999.
- BRASIL. Resolução nº 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 set. 2005. Seção 1, p.375. 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Dezembro, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em 6 de fevereiro de 2018.
- BELEWU, M. A.; BELEWU, K. Y. Comparative Physico-Chemical Evaluation of Tiger-nut Soybean and Coconut Milk Sources. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.9, n.5, 2007.
- CARVALHO, M. R. A. C. G. P.; COELHO, N. R. A. Leite de coco: Aplicações Funcionais e Tecnológicas. **Estudos, Goiânia**, v. 36, n. 5/6, p. 851-65, 2009.
- CHUKWUNONSO, E. C. C. E.; OBIOMA, O. N.; IFEOMA I. I. Consumption of coconut milk did not increase cardiovascular disease risk in mice. **International Journal of Current Research**, v. 6, p. 63–64, 2010.
- CLEUSIX V; LACROIX C; VOLLENWEIDER S; DUBOUX M; LE BLAY G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 1–9, 2007.
- DE LEON, S. Y.; DELORES, M. I. 'Coconut', in Barrett D M , Somogyi L and Ramaswamy, H. S. **Processing Fruits: Science and Technology** , Second Edition , CRC Press , Florida , p. 707 – 737, 2004.
- DEL CAMPO, R.; GARRIGA, M.; PÉREZ-ARAGÓN, A.; GUALLARTE, P.; LAMAS, A.; MÁIZ, L.; BAYÓN, C.; ROY, G.; CANTÓN, R.; ZAMORA, J.; BAQUERO, F.; SUÁREZ, L. Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri* probiotic preparation: a double blind prospective study. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 13(6), p. 716-722, 2014.

DINLEYICI, E. C.; DALGIC, N.; GUVEN, S.; METIN, O.; YASA, O.; KURUGOL, Z.; TUREL, O.; TANIR, G.; YAZAR, A. S.; ARICA, V.; SANCAR, M.; KARBUZ, A.; EREN, M.; OZEN, M.; KARA, A.; VANDENPLAS, Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 91, p. 392-396, 2015.

DZIEZAK, J. D. A focus on gums. **Food Technology**, v. 45, n.3, p. 117-132, 1991.

EL-SAYED, E. M.; ABD EL-GAWAD, I. A.; MURAD, H. A.; SALAH, S. H. Utilization of laboratory-produced xanthan gum in the manufacture of yogurt and soy yogurt. **Europe Food Research Technology**, v. 215, p. 298-304, 2002.

EKANAYAKA, R. A. I.; EKANAYAKA, N. K.; PERERA, B.; DE SILVA, P. G. S. M. Impact of a traditional dietary supplement with coconut milk and soya milk on the lipid profile in normal free living subjects. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2013, 2013.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**, Porto Alegre: Artmed, 4^a ed., 2010, 900 p.

FERNANDO, W. M. A. D. B.; MARTINS, I. J.; GOOZEE, K. G.; BRENNAN, C. S.; JAYASENA, V.; MARTINS, R. N. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 114(1), p.1-14, 2015.

FOALE, M. **The Coconut Odyssey: The bounteous possibilities of the Tree of Life**, Australian Centre for International Collaboration Research, Canberra, Monograph No. 101, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that Are Color Additives, 2014. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm300661.htm#V1B>>, acesso em 17 de fevereiro de 2018.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê Gomas**, n.32, p.28-48, 2015.

GEREZ, C. L.; CUEZZO, S.; ROLLÁN, G.; FONT DE VALDEZ, G. *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 as starter culture for wheat dough fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, p.253-259, 2008.

GU, Q.; ZHANG, C.; SONG, D.; LI, P.; ZHU, X. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 56–59, 2015.

HABIBI, H.; KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 130-140, 2017.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

HOU, C.; ZENG, X.; YANG, F.; LIU, H.; QIAO, S. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6(1), 2015.

HOOVER, D. G.; HUGHES, D. B. Current Status and Future Trends Research and Products of Bifidobacteria-related in the USA. **Bifidobacteria Microflora**, v. 10, n. 2, p. 113–121, 1991.

IFT, 2015. **Dairy free beverages expand the milk aisle**. Disponível em: <<http://www.ift.org/newsroom/news-releases/2015/february/18/dairy-free-beverages-expand-the-milk-aisle.aspx>>, acesso em 11 de fevereiro de 2018.

IFT, 2018. **U.S. non-dairy milk sales surpass \$2 billion in 2017**. Disponível em: <[http://www.ift.org/Food-Technology/Daily-News/2018/January/05/us-non-dairy-milk-sales-surpass-\\$2-billion-in-2017.aspx](http://www.ift.org/Food-Technology/Daily-News/2018/January/05/us-non-dairy-milk-sales-surpass-$2-billion-in-2017.aspx)>, acesso em 11 de fevereiro de 2018.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Review**, v. 59, p. 171–200, 1995.

JANSSON, E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, p. 275-282, 1975.

JESKE, S.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. **Food Research International**, 2017.

JONES, M. L.; MARTONI, C. J.; PARENT, M.; PRAKASH, S. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. **British Journal of Nutrition**, v. 9, p. 1–9, 2012.

KAMADA, N.; CHEN, G. Y.; INOHARA, N.; NÚÑES, G. Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota. **Nature immunology**, v. 14(7), p. 685-690, 2013.

KRAFT-BODI E.; JØRGENSEN M. R.; KELLER M. K.; KRAGELUND C.; TWETMAN S. Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly. **Journal of Dental Research**, v. 94(9 Suppl), 2015.

LANGA, S.; LANDETE, J. M.; MARTÍN-CABREJAS, I.; RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; MEDINA, M. *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products, **Food Control** v. 33 p. 1-5, 2013.

LEITMAN, P.; SOARES, K.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R.C. **Arecaceae em Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

LORENZI, H; DE SOUZA, H.M.; CERQUEIRA, L. S. C.; COSTA, J. T. M.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2004. 416p.

LSPA/IBGE – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro v.29 n.6 p.1-79 junho, 2016.

MÄKINEN, O. E.; UNIACKE-LOWE T.; O'MAHONY J. A.; ARENDT, E. K. Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. **Food Chemistry**, v. 168, p. 630–638, 2015.

MARK, H. F.; OTHMER, D. F.; OVERBERGER, C. G.; SEABORG, G. T. Rheological acta – **Encyclopedia of chemical technology**. 3 ed. USA: John Wiley & Sons, v.12, 1980.

MCCARTHY, K. S.; PARKER, M.; AMEERALLY, A.; DRAKE, S. L.; DRAKE, M. A. Drivers of choice for fluid milk versus plant-based alternatives: What are consumer perceptions of fluid milk? **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6125–6138, 2017.

MI, G. E.; ZHAO, L.; QIAO, D.; KANG, W.; TANG, M.; XU, J. Effectiveness of *Lactobacillus reuteri* in infantile colic and colicky induced maternal depression: a prospective single blind randomized trial. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, p.1547-1553, 2015.

MORITA, H.; TOH, H.; FUKUDA, S. et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. **DNA Research**, v. 15, p. 151-161, 2008.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: Processing, properties and food applications - A Review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 409–418, 2014.

MUNHOZ, M. P.; WEBER, F. H.; CHANG, Y. K. Influencia de hidrocolóides na textura de geleia de amido de milho, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24(3), p.403-406, 2004.

NEUBAUER, H.; MOLLET, B. Biotechnological research and dairy industry. HOFFMAN, M.; THONART, P. (eds). **Engineering and manufacturing for**

biotechnology. Kluwer Academic Publishers, New York, NY, USA, pp. 399-412, 2002.

NIELSEN. **Plant Based Foods Sales Experience 8.1 Percent Growth Over Past Year**. Disponível em: <<http://www.prweb.com/releases/2017/09/prweb14683840.htm>>, acesso em 8 de fevereiro de 2018.

ORTIZ-RIVERA, Y.; SÁNCHEZ-VEGA, R.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; LEÓN-FÉLIX, J.; ACOSTA-MUÑOZ, C.; SEPULVEDA, D. R. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri* : Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4258–4268, 2017.

Ouwehand, A.C.; Vesterlund, S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. Salminen, S.; von Wright, A.; Ouwehand, A., Ed.3. p. 375-395, 2004.

OYETAYO, V. O.; OYETAYO, F. L. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. February, p. 123–127, 2005.

OZEN, M.; DINLEYICI, E. C. The history of probiotics: the untold story. **Beneficial Microbes**, v. 6(2), p. 159-165, 2015.

PERRICONE, M.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; SPERANZA, B.; BEVILACQUA, A. Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 421-426, 2014.

PRASAD, K.; IZAWA, H.; KANEKO, Y.; KADOKAWA, J. Preparation of temperature-induced shapeable film material from guar gum-based gel with an ionic liquid. **Journal of Materials Chemistry**, v.19, p. 4088-4090, 2009.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops: Monocotyledones**. Burnt Mill: Longman, 607p, 1981.

Resolução RDC nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o “Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos”. Órgão emissor: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**.

Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 9 jan. 2002. Órgão emissor: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**.

SANTOS, F.; WEGKAMP, A.; DE VOS, W. M.; SMID, E. J; HUGENHOLTZ, J. High-level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 10, p. 3291–3294, 2008.

SANTOS, C. C. A. A.; LIBECK, B. S.; SCHWAN, R. F. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. **International**

Journal of Food Microbiology, v. 186, p. 32–41, 2014.

SETHI, S.; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53(9), p. 3408-3423, 2016.

SINKIEWICZ, G. *Lactobacillus reuteri* in health and disease. Malmo University Health and Society Doctoral Dissertations, Holmbergs – Malmo, 2010.

SIRIPHANICH, J.; SARADHULDHAT, P.; ROMPHOPHAK, T.; KRISANAPOOK, K.; PATHAVEERAT, S.; TONGCHITPAKDEE, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.), **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**, Vol 3: Cocona to Mango. Woodhead Publishing in Food Science Technology and Nutrition, p. 8–33, 2011.

SRICHAMROEN, A. **Influence of temperature and salt on viscosity property of guar gum**. Naresuan University Journal, v. 15, p. 55–62, 2007.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ed. revisada e ampliada. Campinas-SP, UNICAMP, 2011.

TALARICO, T. L.; W. J. DOBROGOSZ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 674-679, 1989.

TALARICO, T. L.; AXELSSON, L. T.; NOVOTNY, J.; FIUZAT, M.; DOBROGOSZ, W. J. Utilization of Glycerol as a Hydrogen Acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-Propanediol: NAD⁺ Oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56 (4), p. 943-948, 1990.

TANGSUPHOOM, N.; COUPLAND, J. N. Effect of thermal treatments on the properties of coconut milk emulsions prepared with surface-active stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1792-1800, 2009.

YADAV, D. N.; SINGH, K. K.; BHOWMIK, S. N.; PATIL, R. T. Development of peanut milk-based fermented curd. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 2650–2658, 2010.

YAKULT, **Our Story**, disponível em: <<http://yakultme.com/our-story/>>, acesso em 21 de fevereiro de 2018.

YONG, J. W. H.; GE, L.; NG, Y. F.; TAN, S. N. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. **Molecules**, v. 14, p. 5144-5164, 2009.

WALSHAM, A. D. S.; MACKENZIE, D. A.; COOK, V.; WEMYSS-HOLDEN, S.; HEWS, C. L.; JUGE, N.; SCHÜLLER, S. *Lactobacillus reuteri* Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence to Human Intestinal Epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2016.

CAPÍTULO 2 Otimização da fermentação de bebida à base de leite de coco por *Lactobacillus reuteri*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estudar as condições de crescimento de *Lactobacillus reuteri* LR 92 ou DSM 17938 em bebida à base de leite de coco. Um delineamento composto central de face centrada foi conduzido para analisar os efeitos temperatura (31 – 43 °C) e concentração de polpa de coco em água (1:3 – 1:9 (m/v)) na multiplicação celular de *L. reuteri*. Nas condições ótimas, processo fermentativo foi analisado quanto ao número de células viáveis dos probióticos, pH, produção de açúcares e ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e produção de reuterina. O leite de coco forneceu substrato adequado ao crescimento de *L. reuteri* sem a necessidade de suplementação, atingindo viabilidade superior a 8 log UFC/mL. Os parâmetros ótimos para viabilidade das linhagens foram concentração 1:3 (m/v) e 37 °C para LR 92 e concentração 1:3 (m/v) e 34 °C para DSM 17938. Análises químicas indicaram que a sacarose disponível na matriz (aproximadamente 4,4 mg/mL) foi o açúcar utilizado por *L. reuteri* e as linhagens diferiram na produção e teor de ácidos orgânicos. Após fermentação até pH 4,5±0,1 foi conduzido o armazenamento refrigerado (4 °C por 30 dias), no qual a viabilidade celular final no leite de coco foi 7,55±0,07 log UFC/mL para *L. reuteri* LR 92 e 8,57±0,09 log UFC/mL para DSM 17938. Foram detectadas 0,15±0,03 e 0,14±0,04 mM de reuterina produzida pela linhagem DSM 17938 e LR 92, respectivamente. Estes resultados mostram que leite vegetal de coco oferece matriz adequada para desenvolvimento de bebidas funcionais fermentadas.

Palavras-chave: CLAE. Leite vegetal. Probiótico. Superfície de resposta.

1 Introdução

Os produtos de origem vegetal são uma tendência de mercado devido a vários fatores como: alergias e restrições alimentares, busca de estilo de vida mais saudável, diminuição no consumo de alimentos de origem animal e dietas vegetariana e vegana (MCCARTY et al., 2017; IFT, 2015).

Os fermentados disponíveis no mercado são muitas vezes restritos às matrizes lácteas, por isso o consumo de leites vegetais é uma alternativa viável aos indivíduos que não apreciam ou possuem restrição ao consumo destes alimentos. Os leites vegetais são assim denominados por consistirem em líquidos semelhantes ao leite de vaca em aparência (MÄKINEN et al., 2015).

O leite de coco consiste em um líquido extraído a partir do endosperma do coco (*Cocos nucifera* L.) maduro e pode ser misturado à água para consumo na forma de bebida. Este produto contém ácido láurico como componente funcional, que pode promover desenvolvimento de funções cerebrais, estimular defesas do sistema imunológico e manter elasticidade dos vasos sanguíneos (SEOW; GWEE, 1997 apud SETHI; TYAGY; ANURAG, 2016).

Em 2017, as vendas de leites vegetais ultrapassaram 2 bilhões de dólares nos Estados Unidos. O leite vegetal à base de amêndoas apresentou maior crescimento, com 64% das vendas, seguido de 13% de leite de soja e 12% de leite de coco (IFT, 2018). O desenvolvimento de produtos contendo leites vegetais é relativamente novo e com isso, pesquisas são feitas para aumentar os benefícios nutricionais destes alimentos (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Nesse contexto, autores têm demonstrado que leites vegetais são matrizes adequadas ao crescimento de microrganismos fermentadores, produzindo bebidas com grande potencial de mercado devido às possibilidades de criar novos produtos funcionais, utilizando diferentes processos e ingredientes (SANTOS; LIBECK; SCHWAN, 2014; BERNAT et al., 2015(a); ZANNINI et al., 2018). Além disso, a fermentação pode ser essencial para desenvolvimento de sabor das bebidas (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Os probióticos são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e produzir efeitos benéficos à saúde do indivíduo, quando consumido em doses adequadas, diariamente (FAO/WHO, 2001). *Lactobacillus reuteri* mostrou propriedades probióticas, podendo ser utilizado para diminuir cólicas em recém

nascidos, atenuar diarreia aguda em crianças, e diminuir sintomas de gengivite em idosos (FATHEREE et al., 2017; DINLEYICI et al., 2015; KRAFT-BODI et al., 2015).

Esta espécie já demonstrou crescimento em leite de aveia e em leite de amêndoas, atingindo contagens aproximadas de 9 log UFC/mL e 8 log UFC/mL ao final da fermentação, respectivamente (BERNAT et al., 2015a; BERNAT et al., 2015b).

L. reuteri sintetiza o composto antimicrobiano reuterina em meios onde há excesso de glicerol em condições anaeróbias. Já foi demonstrada a produção *in situ* deste composto em leite fermentado, contribuindo assim para a estabilidade microbiológica durante o armazenamento do produto (LANGA et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi otimizar as melhores condições para crescimento de *Lactobacillus reuteri* linhagens LR 92 e DSM 17938 em leite de coco com adição de 100 mM de glicerol, utilizando um desenho fatorial de face centrada com pontos centrais ($\alpha = \pm 1$). Nas condições otimizadas, monitorar o processo fermentativo quanto à viabilidade dos microrganismos, pH, acidez, açúcares e ácidos orgânicos durante 48 horas, determinar a produção de reuterina nos produtos fermentados e avaliar a sobrevivência dos microrganismos durante o armazenamento refrigerado (4°C por 30 dias).

2. Material e Métodos

2.1 Leite de Coco

A polpa de coco maduro foi adquirida do comércio local de Londrina - PR, Brasil. A polpa foi higienizada com água corrente, ralada, homogeneizada e acondicionada em sacos plásticos a - 20 °C. O endosperma de coco foi misturado com água destilada a 70 °C (nas proporções escolhidas no delineamento experimental) em um processador de alimentos para uso doméstico (Philips Walita, Brasil) durante 2 minutos. A suspensão foi filtrada em coador de tecido sintético e os resíduos sólidos foram descartados. Após a obtenção do leite de coco, foi realizada a pasteurização a 95°C por 5 min (SIRIPHANICH et al., 2011).

2.2 MICRORGANISMOS E DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

2.2.1 Microrganismos

Para a fermentação do leite de coco foi utilizada cultura comercial liofilizada composta da linhagem de *Lactobacillus reuteri* LR 92 (DSM 26866, Sacco - Itália) e comprimidos mastigáveis do medicamento Provance (Anexo A), contendo linhagem *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (Aché, Biogaia).

O conteúdo de 0,01% (m/v) do pó liofilizado contendo a linhagem de LR 92 foi adicionado ao leite de coco pasteurizado, contendo 20% (v/v) de glicerol estéril (Synth) e mantido congelado. A linhagem DSM 17938 contida em um comprimido de Provance foi reativada em 9 mL caldo MRS estéril (Himedia), incubada a 37°C por 24 horas, centrifugada (12000xg, 20 min, 4 °C) e lavada duas vezes com solução salina 0,9% (m/v). A biomassa total obtida foi adicionada à 100 mL de leite de coco pasteurizado com 20% (v/v) de glicerol estéril e a linhagem foi mantida congelada.

No momento do uso, foram obtidos pré-inóculos através de duas ativações em leite de coco a 37 °C por 24 horas, e a percentagem desse inóculo de 1% (v/v). A concentração celular de 8 log UFC/mL foi adicionada ao meio fermentativo, o equivalente a 0,3% (v/v) de *L. reuteri* DSM 17938 ou 1% (v/v) de *L. reuteri* LR 92. Dessa forma, todas as fermentações iniciaram com contagens próximas a 6 log UFC/mL.

2.2.2 Determinações Microbiológicas

Para a contagem de *L. reuteri* LR 92 e *L. reuteri* DSM 17938, foram feitas diluições decimais do fermentado em água peptonada 0,1% (m/v) (Himedia) estéril e distribuídas em profundidade de ágar MRS (Himedia) seguido de incubação a 37 °C por 72 horas em jarras com placas geradoras de anaerobiose.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com o objetivo de otimizar e estudar o processo de fermentação do leite de coco por *L. reuteri* LR 92 ou DSM17938, foi conduzido o delineamento composto central de face centrada (DCCFC). O planejamento fatorial 2² teve pontos estrela de

face centrada ($\alpha = \pm 1$) e repetições no ponto central. O delineamento foi escolhido porque os pontos axiais são o centro de cada face do espaço fatorial (cubo de face centrada), requerendo apenas três níveis para cada fator (REZAZADEH et al., 2013). As repetições no ponto central têm a finalidade de fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

As variáveis independentes foram a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de polpa de coco em água (m/v) e a variável resposta foi a contagem de células viáveis de *L. reuteri* em UFC/mL. Os valores das variáveis independentes foram estabelecidos conforme descrito pela literatura ou de acordo com testes preliminares, sendo a temperatura na faixa de 31 a 43 $^{\circ}\text{C}$ (SINKIEWICZ, 2010) e a concentração de polpa de coco em água para o crescimento dos microrganismos na proporção 1:9 a 1:3 (m/v). O tempo de 15 horas para o término da fermentação foi estabelecido de acordo com testes preliminares, nos quais *L. reuteri* já havia atingido a fase estacionária do crescimento bacteriano.

Todas amostras foram acrescidas de 100 mM de glicerol estéril e incubadas em jarras com placas geradoras de anaerobiose para promover a síntese de reuterina. O valor do pH inicial na matriz foi $6,4 \pm 0,1$ para todas as fermentações. O seguinte modelo de regressão polinomial de segunda ordem foi utilizado para correlacionar os dados experimentais obtidos:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_1x_1^2 + \beta_2x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2$$

Onde:

y = variável resposta de viabilidade celular (log UFC/mL);

x1 e x2 = variáveis independentes codificadas (temperatura e concentração de polpa de coco);

β = coeficientes estimados de cada termo do modelo de superfície de resposta.

As variáveis resposta foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para estimar a significância dos parâmetros matemáticos ($p < 0,05$).

2.4 ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO

Foi adicionado 0,3% (v/v) de *L. reuteri* DSM 17938 ou 1% (v/v) de *L. reuteri* LR 92 em leite de coco pasteurizado e incubado à temperatura ótima determinada pelo delineamento experimental por 48 horas em anaerobiose. Todas as fermentações iniciaram com contagens próximas a 6 log UFC/mL de *L. reuteri*. Amostras foram retiradas durante a fermentação (0, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 32 e 48 horas) e análises de viabilidade celular, pH, açúcares e ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram conduzidas.

2.5 DETERMINAÇÃO DO PH E ACIDEZ TITULÁVEL (AT)

Os valores do pH das amostras foram determinados utilizando-se o potenciômetro digital de bancada (Kasvi K39-2014B), e a acidez titulável foi determinada por titulação da amostra com NaOH 0,1M. Os resultados foram expressos em g/100 mL de ácido láctico.

2.6 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CLAE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA)

2.6.1 Preparo das amostras

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas em ultra centrífuga (HITACHI, Ibaraki, Japão) a 230600 xg durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) 0,22 µm (Millex®) para resultar em amostra para determinações de açúcares e ácidos orgânicos. As soluções padrões de glicose, frutose e sacarose (pureza >99% para CLAE, Sigma-Aldrich) foram preparadas em água ultrapura em concentração de 2 mg/mL, assim como as soluções padrões de ácido málico, cítrico, acético e succínico (pureza > 98% para CLAE, Sigma-Aldrich).

2.6.2 Determinação de Açúcares e Ácidos orgânicos

Os açúcares dos produtos fermentados por *L. reuteri* foram determinados durante os tempos pré-fixados no estudo do processo fermentativo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a determinação de glicose, frutose e sacarose foi utilizada a água ultra pura como fase móvel, devido à melhora da resolução cromatográfica e simetria de picos. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu LC 20 (Shimadzu corp., Kyoto, Japão) composto por bomba de alta pressão (LC-20AT), injetor automático (SIL-20AC HT) com volume de injeção ajustado para 20 µL, detector por índice de refração (RID-10A), forno de coluna (CTO-20A) mantido à temperatura constante de 85 °C, módulo de controle (CBM-20A) e coluna de troca iônica Aminex HPX-87P (7,8x300mm na forma iônica Pb⁺², Biorad, CA, EUA).

A determinação dos ácidos málico, láctico, cítrico, succínico e acético foi conduzida no mesmo cromatógrafo que a determinação de açúcares. A coluna cromatográfica utilizada foi Shiseido CapCell Pak 5 µ C18, MG 250 x 4,6 mm. Como fase móvel foi usada uma solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,4, na vazão de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C e o volume de injeção em 20 µL. A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores de índice de Refração (RID-10A) e arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), em comprimento de onda 215 nm e modo de varredura de 200 a 400 nm. O processamento dos dados foi realizado utilizando-se o Software Shimadzu LC Solutions (PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011).

2.7 DETERMINAÇÃO DE REUTERINA

A determinação de reuterina foi feita de acordo com o método fotométrico descrito por Tobajas et al. (2007). As amostras fermentadas com 100 mM de glicerol foram homogeneizadas e submetidas a centrifugação (12000xg, 20 min, 4 °C). Os sobrenadantes foram filtrados (0,22 mM) e utilizados para quantificar a presença de reuterina em triplicata. A acroleína (Sigma-Aldrich) foi utilizada para calibração em tampão fosfato 50 mM pH 7,5. O volume de 1 mL da amostra foi adicionado a 0,75 mL de triptofano 10 mM e dissolvido em 0,05 N HCl. Após adição de 3 mL de HCl 37 %, a mistura foi incubada a 37 °C por 20 minutos e a absorvância foi medida a 560

nm. A partir da curva padrão obtida entre as concentrações 0,05 a 6 mM de acroleína em solução tampão-fosfato, foi possível a quantificação molar da reuterina.

2.8 ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO

Após análise do processo fermentativo, conduziu-se a fermentação das linhagens *L. reuteri* DSM 17938 e LR92 em leite de coco até pH $4,5 \pm 0,1$, faixa de pH usual para produção de fermentados lácteos (YILDIZ, 2009). Foram acondicionados 40 mL dos fermentados em frascos tipo falcon de 50mL e foram mantidos à temperatura de refrigeração à 4 °C por 30 dias. Análises de viabilidade celular, pH e acidez em ácido láctico foram conduzidas em triplicata nos tempos 0 (após o término da fermentação), 1, 15 e 30 dias do armazenamento.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA), teste t de Student ou teste de Tukey, para comparação de médias ao nível de 5% de significância, empregando-se o programa STATISTICA 8.0. Os gráficos foram desenvolvidos no GraphPad Prism 5.

3 Resultados e Discussão

3.1 OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO POR DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL DE FACE CENTRADA

Os efeitos das variáveis temperatura e concentração de polpa de coco sobre as contagens de células viáveis de *L. reuteri* (log UFC/mL) estão apresentados na Tabela 1. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e dois blocos (replicata 1 e 2), totalizando 24 ensaios. As respostas de contagem (células viáveis) variaram entre 6,98 a 8,95 log UFC/mL e 6,87 a 8,50 log UFC/mL para as linhagens DSM 17938 e LR 92, respectivamente.

Estes dados indicam que ambas as linhagens de *L. reuteri* foram capazes de se multiplicar no leite de coco sem a necessidade de suplementação de açúcares, utilizando como fonte de energia os açúcares contidos naturalmente no substrato.

Apenas na condição 1:9 (m/v) a 43 °C ocorreu menor multiplicação celular, tendo em vista que a concentração inicial de células viáveis no meio fermentativo foi de aproximadamente 6 log UFC/mL.

Tabela 1 – Delineamento Composto Central de Face Centrada (DCCFC) para fermentação de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 e *Lactobacillus reuteri* LR92 e variável resposta.

Replicata	Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis descodificadas		Resposta Contagem	
		X1	X2	X1	X2	Y _P	Y _L
1	1	-1	-1	31	1:9	8,55	7,74
	2	-1	1	31	1:3	8,83	8,24
	3	1	-1	43	1:9	6,98	6,87
	4	1	1	43	1:3	7,59	7,94
	5	-1	0	31	1:6	8,58	7,92
	6	1	0	43	1:6	7,45	7,66
	7	0	-1	37	1:9	8,22	8,06
	8	0	1	37	1:3	8,89	8,48
	9	0	0	37	1:6	8,79	8,10
	10	0	0	37	1:6	8,83	7,95
	11	0	0	37	1:6	8,44	7,86
	12	0	0	37	1:6	8,51	7,84
2	13	-1	-1	31	1:9	8,52	8,06
	14	-1	1	31	1:3	8,87	8,16
	15	1	-1	43	1:9	7,46	6,90
	16	1	1	43	1:3	8,26	7,95
	17	-1	0	31	1:6	8,54	8,00
	18	1	0	43	1:6	7,43	7,70
	19	0	-1	37	1:9	8,52	8,16
	20	0	1	37	1:3	8,95	8,50
	21	0	0	37	1:6	8,78	7,84
	22	0	0	37	1:6	8,42	8,12
	23	0	0	37	1:6	8,79	7,83
	24	0	0	37	1:6	8,78	8,20

X1: temperatura de incubação (°C); X2: concentração da polpa de coco (m/v); Y_P: contagem de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, expressa em log UFC/mL; Y_L: contagem de *Lactobacillus reuteri* LR 92, expressa em log UFC/mL.

A partir dos dados obtidos, foi realizada a ANOVA para verificar a influência das variáveis independentes X₁ (temperatura) e X₂ (concentração da polpa de coco) nas variáveis resposta contagem após 15 horas de fermentação (Tabela 2). Os

resultados mostraram que ambas as variáveis apresentaram efeitos no crescimento bacteriano de *L. reuteri*.

Os valores de R^2 foram 0,93 e 0,83 para *L. reuteri* DSM 17938 e LR 92, respectivamente. Ambos se encontraram acima de 0,8 para os dois parâmetros estudados, indicando que os modelos conseguem explicar acima de 80% os valores observados no experimento e por isso, podem ser usados para fins preditivos. Os experimentos não apresentaram variação significativa entre os blocos (replicata 1 e 2) ($p < 0,05$).

Tabela 2. ANOVA de células viáveis de *L. reuteri* DSM 17938 e *L. reuteri* LR 92 em leite de coco.

	Fonte de variação	SQ	GL	MS	F	p valor	R^2
DSM 17938	Bloco	0,115	1	0,115	3,665	0,0730	0,93
	X1 (L)	3,763	1	3,763	120,112	0,0000*	-
	X1 (Q)	1,864	1	1,864	59,507	0,0000*	-
	X2 (L)	0,822	1	0,822	26,224	0,0001*	-
	X2 (Q)	0,015	1	0,015	0,492	0,4930	-
	X1 (L).X2 (L)	0,076	1	0,076	2,427	0,1380	-
	Erro	0,533	17	0,031			
	SQ total	7,296	23				
LR 92	Bloco	0,024	1	0,024	0,709	0,4116	0,83
	X1 (L)	0,801	1	0,801	23,578	0,0002*	-
	X1 (Q)	0,682	1	0,682	20,069	0,0003*	-
	X2 (L)	1,009	1	1,009	29,713	0,0000*	-
	X2 (Q)	0,080	1	0,080	2,356	0,1431	-
	X1 (L).X2 (L)	0,289	1	0,289	8,503	0,0096*	-
	Erro	0,577	17	0,034			
	SQ total	3,382	23				

X1: Temperatura codificada; X2: concentração de polpa de coco codificada. (L) linear; (Q) quadrático.

*significativo ($p < 0,05$)

Considerando apenas as variáveis significativas, foram propostos os modelos (Eq. 1 e Eq. 2) que representam a contagem de células viáveis de *L. reuteri* DSM 17938 (Y_P) e *L. reuteri* LR 92 (Y_L) em log UFC/mL em função das variáveis independentes:

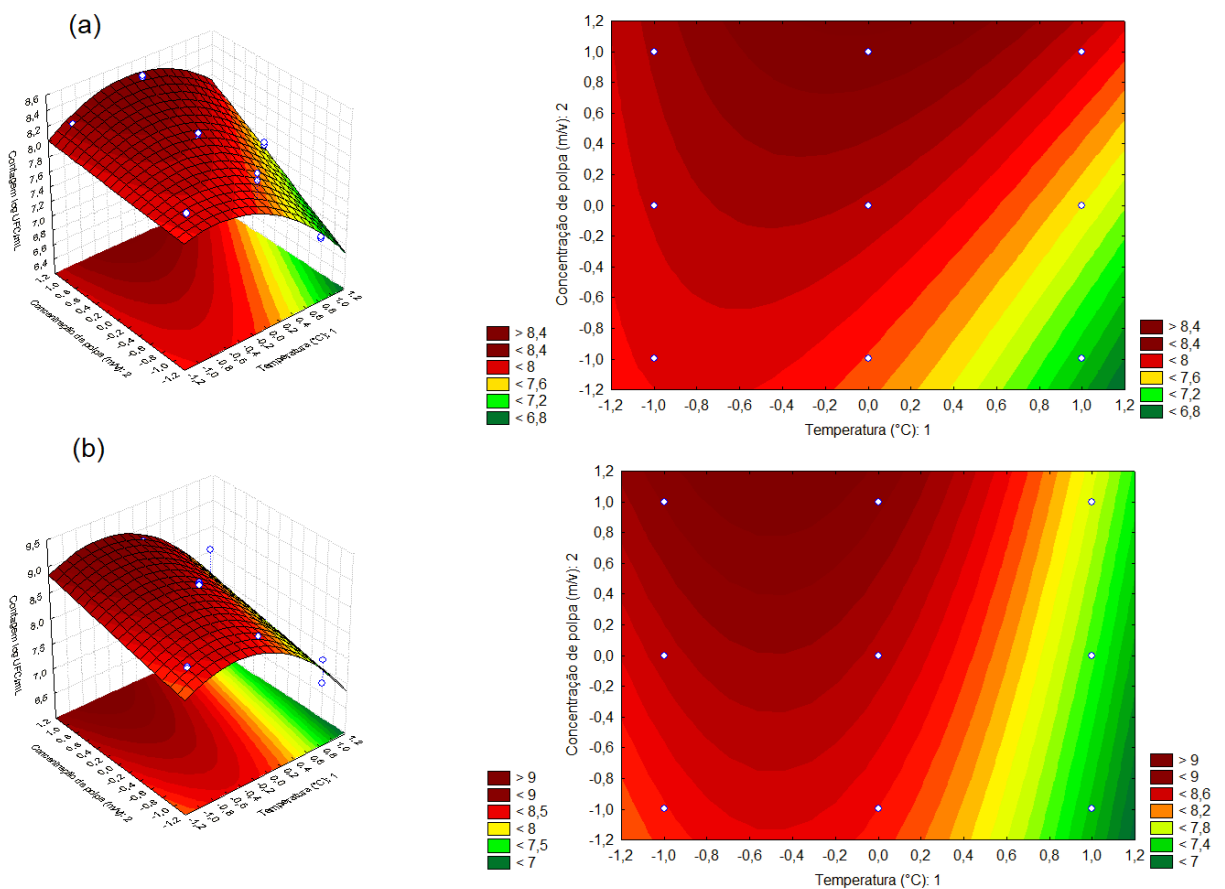
$$Y_P = 8,66 - 0,56 X_1 - 0,57 X_1^2 + 0,26 X_2 \quad (R^2: 0,91) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Y_L = 8,08 - 0,26 X_1 - 0,32 X_1^2 + 0,29 X_2 + 0,19 X_1.X_2 \quad (R^2: 0,80) \quad (\text{Eq. 2})$$

Os efeitos quadráticos de temperatura dos modelos apresentaram valores negativos, indicando um ponto de máxima resposta para células viáveis. A concentração de polpa de coco apresentou apenas o efeito linear significativo.

O gráficos de superfície de resposta para o leite de coco fermentado por *L. reuteri* LR 92 e DSM7938 encontram-se na Figura 1 (a) e 1 (b), respectivamente.

Figura 1 – Gráficos de superfície de resposta 3 D e curvas de contorno em função da temperatura e concentração de polpa de coco para a contagem de células viáveis de *L. reuteri* LR 92 (a) e *L. reuteri* DSM 17938 (b).



A concentração de polpa de coco foi estudada para definir se os microrganismos seriam capazes de se multiplicarem em concentrações menores deste substrato, já que a formulação ótima deve ser definida como aquela que requer custos mínimos de produção. Contudo, foi observado que na concentração do ponto central (1:6 (m/v)), o número de células viáveis de *L. reuteri* DSM 17938 e LR 92 encontrava-se significativamente abaixo do número encontrado na maior concentração (1:3) e por isso, esta foi escolhida.

O efeito da temperatura para a linhagem LR 92 atingiu melhor resposta no ponto central, quando a temperatura foi 37 °C. Este resultado está de acordo com Liu et al. (2014), que determinaram através de metodologia de superfície de resposta o pH ideal de fermentação (5,7) e a temperatura (37 °C) para produção máxima de células viáveis de *L. reuteri* I5007 em meio MRS. Entretanto, resultados divergentes foram observados quando a matriz fermentativa utilizada foi extrato de juçara, onde a temperatura ótima observada foi 32 °C para a linhagem *L. reuteri* LR 92 (GUERGOLETTI, 2015).

No modelo proposto para a linhagem DSM 17938, verificou-se que a temperatura ótima (34 °C) não se encontrava nos testes conduzidos. Porém, como a configuração fez parte do intervalo considerado, foi feita uma nova análise em triplicata nas condições ótimas (34 °C; 1:3 (m/v)) para validação do modelo. O crescimento atingiu contagens de $\log 9,14 \pm 0,02$ UFC/mL, confirmando a resposta estimada teórica de 9,13 log UFC/mL para o produto. Os resultados do ponto ótimo para LR 92 também foram validados após repetição dos experimentos em triplicata e as médias não diferiram da resposta estimada no teste de Tukey ($p < 0,05$).

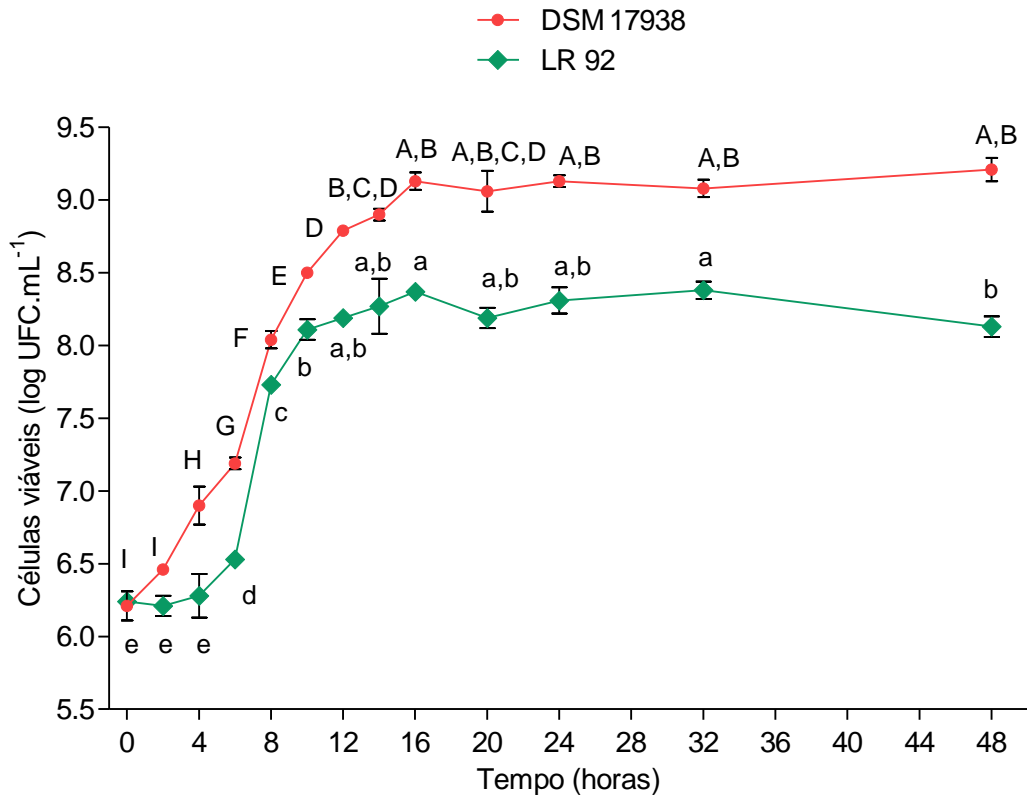
A temperatura ótima de crescimento de *Lactobacillus* spp. pode variar entre espécies e entre linhagens. Em extrato de soja fermentado por *Lactobacillus plantarum* BG 112, a temperatura ótima encontrada foi 37 °C, enquanto que *Lactobacillus acidophilus* LA3 apresentaram melhor crescimento a 31 °C (MORAES FILHO; BUSANELLO; GARCIA, 2016). Quando incubado à temperaturas de 37 °C e 45 °C, *L. reuteri* SD2112 exibiu crescimento rápido em leite (ØSTLIE; HELLAND; NARVHUS, 2003). No entanto, no presente estudo utilizando o leite de coco como matriz fermentativa, foi observado menor crescimento de ambas as linhagens de *L. reuteri* quando a temperatura utilizada foi 43 °C.

3.2 ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO

3.2.1 Viabilidade de *L. reuteri*

As condições ótimas obtidas através de DCCFC foram utilizadas no ensaio de análise do processo fermentativo dos microrganismos em leite de coco. A Figura 2 apresenta a viabilidade das linhagens *L. reuteri* DSM 17938 e LR 92 durante fermentação de 48 h.

Figura 2 – Processo fermentativo de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 a 34 °C e *Lactobacillus reuteri* LR 92 a 37 °C em leite de coco 1:3 (m/v) durante 48 horas.



*Letras maiúsculas (DSM 17938) e minúsculas (LR 92) iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Para fins comparativos, a concentração inicial (0 h) de células viáveis para as linhagens foi de $6,24 \pm 0,03$ log UFC/mL e $6,21 \pm 0,10$ para DSM 17938 e LR 92, respectivamente. Pode-se observar que a linhagem LR 92 apresentou 4 horas de fase lag e contagem acima de 8 log UFC/mL após 10 horas de fermentação. Já a linhagem DSM 17938 apresentou fase lag de 2 h e em consequência, atingiu aproximadamente o mesmo número de células viáveis em apenas 8 horas de fermentação. A duração da fase lag pode ser influenciada por diferenças no metabolismo das linhagens em adaptarem-se às condições ambientes. Neste estudo, a reativação dos inóculos em leite de coco foi feita para reduzir a fase de adaptação das linhagens no momento da inoculação, porém como foi observado, esta fase ainda pode ocorrer.

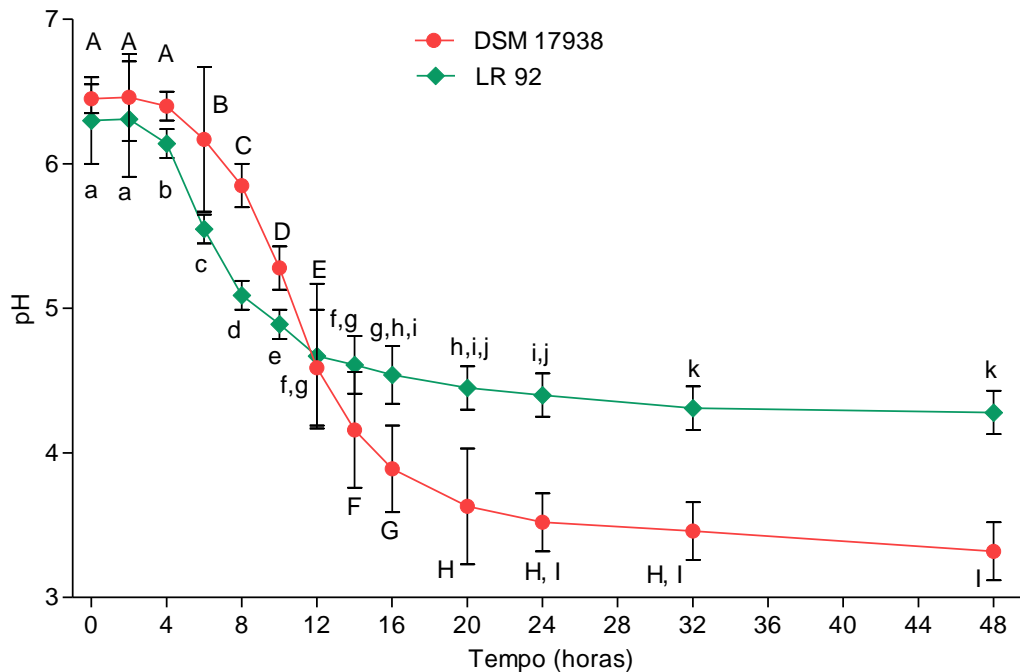
A linhagem DSM 17938 adaptou-se melhor à matriz de leite de coco, apresentando desempenho superior no processo fermentativo, com aumento de 3 ciclos logarítmicos até atingir a fase estacionária, enquanto que a linhagem LR 92 apresentou aumento de 2 ciclos.

Em um trabalho anterior, o desenvolvimento de um *blend* de cenoura e mirtilo fermentado pela mesma linhagem de *Lactobacillus reuteri* LR 92 levou 40 horas para atingir contagens de $10,26 \pm 0,23$ log UFC/mL, valor acima do máximo encontrado no presente trabalho (MAURO; GUERGOLETTTO; GARCIA, 2016). Já a fermentação de leite de aveia por *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 após 4 horas atingiu contagens máximas de 9 log UFC/mL de produto. Entretanto, neste meio foi feita a suplementação de glicose, frutose e inulina, além da fermentação combinada com *Streptococcus thermophilus* para atingir maior número de células viáveis em menos tempo (BERNAT et al., 2015a). Dessa forma, pode-se afirmar que o metabolismo da bactéria sofre interferência da matriz fermentativa utilizada, como o teor de açúcares fermentescíveis e nutrientes.

3.2.2 pH

A Figura 3 apresenta os valores de pH durante o crescimento de *L. reuteri* DSM 17938 e LR 92. O leite de coco fermentado pela linhagem DSM 17938 apresentou pH inicial 6,45 e final 3,32. Já o fermentado pela linhagem LR 92 apresentou pH inicial 6,36 e final 4,28.

Figura 3 – Valores de pH durante o processo fermentativo de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 a 34 °C e *Lactobacillus reuteri* LR 92 a 37 °C em leite de coco 1:3 (m/v) durante 48 horas.



*Letras maiúsculas (DSM 17938) e minúsculas (LR 92) iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Observou-se que o pH da matriz fermentativa reduziu nas primeiras 12 horas até valores próximos. Após esse período, DSM 17938 apresentou valores de pH inferiores ao da linhagem LR 92. O pH da matriz fermentada por *L. reuteri* DSM 17938 se estabilizou após 24 horas, enquanto que LR 92 apresentou estabilização após 32 horas do processo fermentativo.

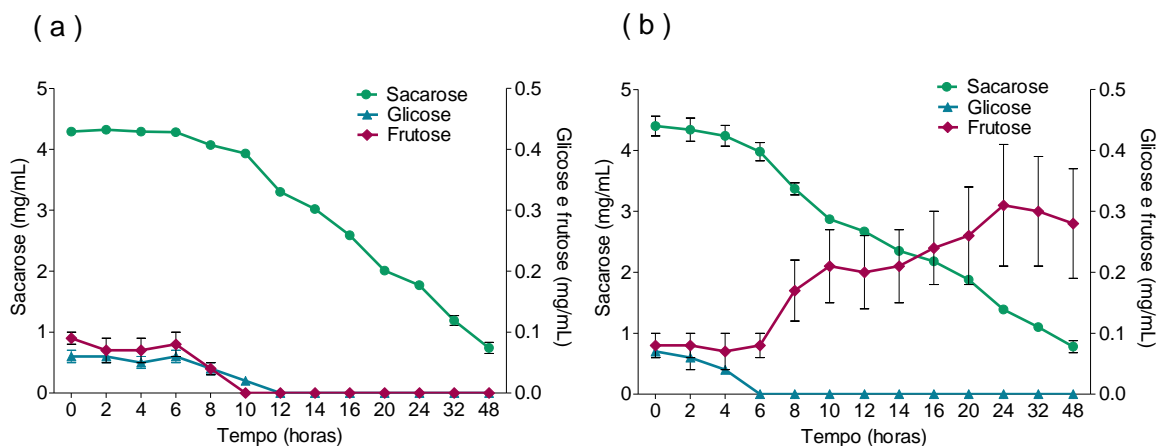
A fermentação em farinha de cevada para panificação também revelou diferenças no pH entre linhagens de *L. reuteri*, sendo que a capacidade de redução do pH foi maior para *L. reuteri* DSM 17938 (PALLIN et al., 2016).

3.2.3 Determinação de açúcares

O perfil de açúcares do leite de coco na diluição 1:3 (m/v) durante a fermentação de *L. reuteri* está apresentado na Figura 4. A concentração de açúcares inicial está de acordo com o teor encontrado em polpa de coco maduro, que

apresenta na sua composição concentrações maiores de sacarose, quando comparada às de frutose e glicose (SANTOSO et al., 1996). Como foi feita a trituração da polpa com água, o valor encontrado em leite de coco é proporcional à diluição utilizada e processamento.

Figura 4 – Metabolização de açúcares por *L. reuteri* DSM 17938 (a) a 34 °C e LR 92 (b) a 37 °C em leite de coco 1:3 (m/v) durante 48 horas.



Houve hidrólise e consumo de sacarose por ambas as linhagens ao longo de 48 horas. O teor inicial de sacarose foi 4,3 a 4,4 mg/mL, consumido até atingir valores finais de 0,7 a 0,8 mg/mL, para *L. reuteri* DSM 17938 e LR 92, respectivamente.

Nas primeiras horas de fermentação, *L. reuteri* DSM 17938 consumiu frutose ($0,09 \pm 0,01$ mg/mL) e glicose ($0,06 \pm 0,01$ mg/mL), açúcares que mesmo em pouca quantidade, foram utilizados pelo microrganismo por se tratarem de monossacarídeos facilmente fermentescíveis. Quando houve esgotamento, a bactéria se comportou de modo a hidrolisar a molécula de sacarose. Não foram detectadas glicose e frutose após o período de 12 horas, sugerindo a eficiência de quebra e consumo simultâneo destes açúcares. As fontes preferenciais de carbono utilizadas por *L. reuteri* são maltose, sacarose e rafinose, sendo a utilização de pentoses específica de cada linhagem (ZHAO; GANZLE, 2018).

A linhagem LR 92 apresentou hidrólise da molécula de sacarose em frutose e glicose, mas a bactéria não consumiu frutose do mesmo modo que DSM 17938. É possível observar que há um acúmulo de frutose na matriz fermentativa, atingindo $0,28 \pm 0,09$ mg/mL após 48 horas de fermentação. Em um estudo conduzido por Pallin et al. (2016), *L. reuteri* mostrou não consumir frutose em meio contendo

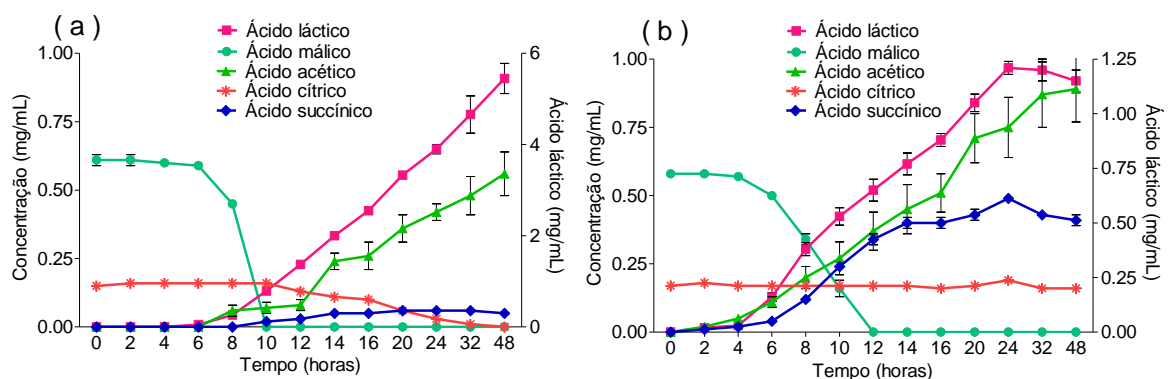
apenas este açúcar como fonte de carbono. Porém, o microrganismo utilizou frutose como acceptor de elétrons no meio contendo glicose.

3.2.4 Determinação de ácidos orgânicos

A Figura 5 mostra a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação de *L. reuteri* DSM 17938 (a) e LR 92 (b). Há ocorrência natural de ácido málico e cítrico na polpa de coco maduro, presentes no tempo inicial da fermentação do leite de coco (SANTOSO et al., 1996).

Pode-se perceber através dos gráficos que houve consumo de ácido málico pelas duas linhagens entre 10 a 12 horas, indicando a ocorrência de fermentação maloláctica. Nesta fermentação realizada por bactérias ácido lácticas, há desvio metabólico com descarboxilação do ácido málico em ácido láctico, aumentando o crescimento celular em meios que contém ácido málico como fonte de carbono. Já foi demonstrado que *Lactobacillus plantarum* CECT 220 foi capaz de degradar ácido málico como um sistema de proteção em valores baixos de pH, com produção de energia (ATP) resultante deste processo (GARCÍA; ZUNIGA; KOBAYASHI, 1992).

Figura 5 – Produção de ácidos orgânicos por *L. reuteri* DSM 17938 (a) e LR 92 (b) durante fermentação de 48 horas



No leite de coco fermentado pela linhagem LR 92 houve síntese de ácido láctico, acético e succínico em concentrações inferiores a 1,2 mg/mL. No entanto, no leite de coco fermentado por DSM 17938, foi detectada a produção de elevada de ácido láctico ($5,45 \pm 0,33$ mg/mL) e ácido acético em menor proporção ($0,56 \pm 0,08$

mg/mL) após 48 horas, não sendo detectada produção de ácido succínico. Similarmente, Pallin et al. (2016) encontraram concentrações mais baixas de ácido succínico em massa de cevada fermentada por *L. reuteri* DSM 17938. Além disso, os autores detectaram maiores concentrações de ácido láctico em comparação às outras linhagens de *L. reuteri* analisadas.

A síntese de ácido láctico por DSM 17938 atingiu a concentração máxima de $5,45 \pm 0,33$ mg/mL, valor 4,7 vezes superior à de LR 92 ao final de 48 horas de fermentação. Årsköld et al. (2008) constataram a presença dos genes para ambas as vias homofermentativa e heterofermentativa durante a fermentação de *L. reuteri* ATCC 55730. A linhagem que constitui o medicamento Provance (DSM 17938) é derivada da linhagem ATCC 55730, diferindo apenas em dois plasmídeos que contêm genes resistentes a antibióticos (ROSANDER; CONNOLLY; ROOS, 2008). Por isso, pode-se explicar a maior produção de ácido láctico pela linhagem DSM 17938 em leite de coco devido à possível existência da via glicolítica das bactérias homofermentativas, que pode ter sido utilizada pelo microrganismo.

A concentração de ácido cítrico naturalmente presente no leite de coco manteve-se estável, não diferindo significativamente ao longo da fermentação por LR 92 ($p < 0,05$). Entretanto, na fermentação por DSM 17938, a concentração de ácido cítrico inicial ($0,16 \pm 0,01$ mg/mL) apresentou declínio até reduzir a zero em 48 horas. Já foi descrito que *L. reuteri* SD 2112 foi capaz de metabolizar citrato utilizando a via heterofermentativa, resultando em produção de dióxido de carbono e ácido acético, o que pode explicar ausência de ácido cítrico na matriz (ØSTLIE; HELLAND; NARVHUS, 2003).

3.3 ESTABILIDADE DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

A caracterização dos fermentados durante o armazenamento por 30 dias a 4 °C está apresentada na Tabela 3. A duração de fermentação foi 12 horas a 34 °C para DSM 17938 e 14 horas a 37 °C para LR 92 até atingirem pH $4,5 \pm 0,1$.

A linhagem DSM 17938 apresentou aumento significativo das células viáveis em apenas 1 dia após o término da fermentação, com consequente diminuição do pH. Essa característica denota uma capacidade de crescimento em temperatura refrigeração e pós acidificação desta linhagem. No entanto, foi observada uma redução das contagens após 15 dias de armazenamento.

Diferentemente de DSM 17938 a linhagem LR 92 apresentou baixa pós acidificação e pH estável entre os dias 0 e 1. As células viáveis apresentaram diminuição em 15 dias e se mantiveram estáveis até o final do período de 30 dias.

Tabela 3. Valor de pH, acidez titulável e contagem de células viáveis de *L. reuteri* linhagens DSM 17938 e LR 92 em leite de coco fermentado durante 0, 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C.

Tempo (dias)	<i>L.reuteri</i> DSM 17938			<i>L. reuteri</i> LR 92		
	Viabilidade (log UFC/mL)	pH	Acidez (ácido láctico g/100mL)	Viabilidade (log UFC/mL)	pH	Acidez (ácido láctico g/100mL)
0	8,64 ± 0,02 ^b	4,53 ± 0,06 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	8,04 ± 0,07 ^a	4,59 ± 0,05 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
1	8,91 ± 0,15 ^a	4,05 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,02 ^a	8,10 ± 0,02 ^a	4,58 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,02 ^a
15	8,70 ± 0,07 ^{abc}	3,91 ± 0,02 ^c	0,22 ± 0,02 ^b	7,61 ± 0,06 ^b	4,44 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,02 ^a
30	8,57 ± 0,09 ^{bc}	3,60 ± 0,01 ^d	0,46 ± 0,04 ^c	7,55 ± 0,07 ^b	4,33 ± 0,03 ^c	0,16 ± 0,01 ^a

*Os resultados estão apresentados em cálculo médio de três repetições; médias na mesma coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$).

Os resultados encontrados neste trabalho ao final de 30 dias de armazenamento mostram que houve redução de 0,8% na viabilidade de *L. reuteri* DSM 17938 e 6,1 % de redução na viabilidade de *L. reuteri* LR 92.

Embora a informação sobre as concentrações efetivas mínimas de probióticos não esteja estabelecida, é geralmente aceito que os produtos probióticos devem ter uma concentração mínima de 10^6 UFC/mL ou grama e que um total de 10^9 UFC de probiótico devem estar presentes na porção do produto no momento do consumo (KECHAGIA et al., 2013; HILL et al., 2014). Sendo assim, os valores de viabilidade $8,57 \pm 0,09$ e $7,55 \pm 0,07$ log UFC/mL para *L. reuteri* DSM 17938 e LR 92, respectivamente, estão de acordo com os parâmetros citados.

Langa et al. (2013) observaram que diferentes linhagens de *L. reuteri* não se multiplicaram em iogurte durante armazenamento a 6 °C e apresentaram redução de contagens ao final de 28 dias de armazenamento ($5,88$ a $3,02$ log UFC/mL) decorrentes da sensibilidade à baixa temperatura. No armazenamento de leite de aveia fermentado, a contagem de *L. reuteri* ATCC 55730 foi $7,43 \pm 0,06$ log UFC/mL após 28 dias de armazenamento a 4 °C (BERNAT et al., 2015a). Tais resultados apresentam viabilidade abaixo da encontrada em leite de coco fermentado.

A acidez de leite de coco fermentado no tempo inicial foi $0,15 \pm 0,01$ g/100 mL de ácido láctico para DSM 17938 (12 h de fermentação), até o valor de $0,46 \pm 0,04$ g/100 mL ao final de 30 dias. Para LR 92 (14 h de fermentação), o valor inicial foi $0,13 \pm 0,01$ g/100 mL e final, $0,16 \pm 0,01$ g/100 mL. Com isso, foi observada uma maior pós acidificação pela linhagem DSM 17938.

Resultados muito semelhantes foram encontrados por Bernat et al. (2015.a) com aveia fermentada por *L. reuteri* ATCC 55730 e *S. thermophilus* CECT 986, onde a acidez em ácido láctico encontrada foi de 0,17 g/100 mL no produto com faixa de pH 4,4 – 4,6 e aumentou até atingir valor de $0,5 \pm 0,04$ g./100 mL em 28 dias de armazenamento.

A acidez titulável, apesar de pronunciada em *L. reuteri* DSM 17938 resultante da pós acidificação durante o armazenamento, encontra-se abaixo de valores descritos para leite fermentado. Com isso, os resultados atribuem característica pouco acidificante de *Lactobacillus reuteri* em leites vegetais, tendo em vista que a acidez para produtos lácteos fermentados varia entre 0,7 a 0,9 % de ácido láctico (FDA, 2009).

Santos, Libeck e Schwan (2014) observaram que culturas puras de bactérias lácticas não foram capazes de promover acidificação similar à do leite em matriz de leite vegetal de amendoim e soja, atingindo valores inferiores à 0,2 % (m/m) de ácido láctico. Estes autores observaram que no cultivo combinado de diferentes linhagens, a acidez titulável aumentou até 0,48 % (m/m) após 24 horas de fermentação.

3.4 ANÁLISE DE REUTERINA

Após a adição de glicerol em condições anaeróbias, o microrganismo *L. reuteri* DSM 17938 produziu $0,15 \pm 0,03$ mM de reuterina quando o pH atingiu valor de $4,5 \pm 0,1$ (12 h). Da mesma forma, *L. reuteri* LR 92 produziu $0,14 \pm 0,04$ mM de reuterina na mesma faixa de pH (14 h), não diferindo significativamente da linhagem anterior ($p < 0,05$).

Spinler et al. (2014) analisaram produção de reuterina por *L. reuteri* DSM 17938 quando submetido ao processo fermentativo em caldo MRS, na qual esta atingiu concentração de 9 mM durante a fase logarítmica (4 h) até aproximadamente 140 mM durante a fase estacionária (12 h). Em testes antimicrobianos, a menor

concentração de reuterina capaz de inibir *Escherichia coli* DH5 α em leite fermentado foi 0,9 mM (ORTIZ-RIVERA et al., 2017).

Essas concentrações são muito superiores à encontrada no presente estudo e por isso, pode-se afirmar que o leite de coco 1:3 (m/v) não constituiu uma matriz favorável à produção de reuterina *in situ*. Tal fato pode ser explicado pela ausência de suplementação de carboidratos no leite de coco, já que a presença de glicerol no meio de cultura com mais fontes utilizáveis de carbono e energia, resulta em maior taxa de crescimento de *L. reuteri* e produção de reuterina (TALARICO et al., 1990).

4 Conclusão

Os resultados mostram que o substrato leite de coco forneceu nutrientes necessários para a fermentação de *L. reuteri* DSM17938 e LR 92 sem a necessidade de suplementação. A contagem de células viáveis após o fim do armazenamento a 4 °C por 30 dias foi $8,57 \pm 0,09$ e $7,55 \pm 0,07$ log UFC/mL para *L. reuteri* DSM 17938 e LR 92, respectivamente. A linhagem *L. reuteri* DSM 17938 apresentou melhor desempenho no processo fermentativo e maior produção de ácido láctico, porém apresentou acentuada diminuição de pH e aumento de acidez (pós acidificação) até o final do período de armazenamento refrigerado. A linhagem LR 92 apresentou baixa pós acidificação quando submetida às mesmas condições de armazenamento. Portanto, foi possível observar que *L. reuteri* LR 92 foi a linhagem mais indicada para visando o uso industrial para desenvolvimento de produtos funcionais a partir de leite de coco.

5 Referências

ÅRSKÖLD, E.; LOHMEIER-VOGEL, E.; CAO, R.; ROOS, S.; RÅDSTRÖM, P.; VAN NIEL, E. W. J. Phosphoketolase Pathway Dominates in *Lactobacillus reuteri* ACC 55730 Containing Dual Pathways for Glycolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 190(1), p. 206-212, 2008.

BARROS NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria: 4. Ed. Campinas; Porto Alegre: Bookman, 414p, 2010.

BERNAT, N.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, J.; CHIRALT, A. Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by

using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 2, p. 145–157, 2015a.

BERNAT, N.; CHÁFERA, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Probiotic fermented almond “milk” as an alternative to cow-milk yoghurt. **International Journal of Food Studies IJFS**, v. 4, n. October, p. 201–211, 2015b.

DINLEYICI, E. C.; DALGIC, N.; GUVEN, S.; METIN, O.; YASA, O.; KURUGOL, Z.; TUREL, O.; TANIR, G.; YAZAR, A. S.; ARICA, V.; SANCAR, M.; KARBUZ, A.; EREN, M.; OZEN, M.; KARA, A.; VANDENPLAS, Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 91, p. 392-396, 2015.

FATHEREE, N. Y.; LIU, Y.; TAYLOR, C. M.; HOANG, T. K.; CAI, C.; RAHBAR, M. H.; HESSABI, M.; FERRIS, M.; MCMURTHY, V.; WONG, C.; VU, T.; DANCSAK, T.; WANG, T.; GLEASON, W.; BANDLA, V.; NAVARRO, F.; TRAN, D. Q.; RHOADS, J. M. *Lactobacillus reuteri* for Infants with Colic: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. **Journal of Pediatrics**, v. 191, p. 170–178.e2, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Milk and Cream Products and Yogurt Products; Proposal to Revoke the Standards for Lowfat Yogurt and Nonfat Yogurt and to Amend the Standard for Yogurt, 2009. Disponível em: <<https://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/E9-736.htm>> acesso em 27 de fevereiro de 2018.

GARCIA, M. J.; ZUNIGA, M.; KOBAYASHI, H. Energy production from L-malic acid degradation and protection against acidic external pH in *Lactobacillus plantarum* CECT 220. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 12, p. 2519–2524, 1992.

GUERGOLETTTO, Karla Bigetti. **Fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) como matéria-prima para novos produtos probióticos, fermentação no cólon e atividade antioxidante**. 2015. 166 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

IFT, 2015. **Dairy free beverages expand the milk aisle**. Disponível em: <<http://www.ift.org/newsroom/news-releases/2015/february/18/dairy-free-beverages-expand-the-milk-aisle.aspx>>, acesso em 11 de fevereiro de 2018.

IFT, 2018. **U.S. non-dairy milk sales surpass \$2 billion in 2017**. Disponível em: <[http://www.ift.org/Food-Technology/Daily-News/2018/January/05/us-non-dairy-milk-sales-surpass-\\$2-billion-in-2017.aspx](http://www.ift.org/Food-Technology/Daily-News/2018/January/05/us-non-dairy-milk-sales-surpass-$2-billion-in-2017.aspx)>, acesso em 11 de fevereiro de 2018.

JESKE, S.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. **Food Research International**, 2017.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPOULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M. Health Benefits of Probiotics: A Review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

KRAFT-BODI E.; JØRGENSEN M. R.; KELLER M. K.; KRAGELUND C.; TWETMAN S. Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly. **Journal of Dental Research**, v. 94(9 Suppl), 2015.

LANGA, S.; LANDETE, J. M.; MARTÍN-CABREJAS, I.; RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; MEDINA, M. *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products, **Food Control** v. 33 p. 1-5, 2013.

LIU, X. T.; HOU, C. L.; ZHANG, J.; ZENG, X. F.; QIAO, S. Y. Fermentation conditions influence the fatty acid composition of the membranes of *Lactobacillus reuteri* I5007 and its survival following freeze-drying. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 398–403, 2014.

MÄKINEN, O. E.; UNIACKE-LOWE T.; O'MAHONY J. A.; ARENDT, E. K. Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. **Food Chemistry**, v. 168, p. 630–638, 2015.

MAURO, C. S. I.; GUERGOLETTO, K. B; GARCIA, S. Development of Blueberry and Carrot Juice Blend Fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 37, 2016.

MCCARTHY, K. S.; PARKER, M.; AMEERALLY, A.; DRAKE, S. L.; DRAKE, M. A. Drivers of choice for fluid milk versus plant-based alternatives: What are consumer perceptions of fluid milk? **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6125–6138, 2017.

MORAES FILHO, M. L.; BUSANELLO, M.; GARCIA, S. Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 456–464, 2016.

ORTIZ-RIVERA, Y.; SÁNCHEZ-VEGA, R.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; LEÓN-FÉLIX, J.; ACOSTA-MUÑIZ, C.; SEPULVEDA, D. R. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri* : Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4258–4268, 2017.

ØSTLIE, H. M.; HELLAND, M. H.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 1–2, p. 17–27, 2003.

PALLIN, A.; AGBACK, P.; JONSSON, H.; ROOS, S. Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. **Food Microbiology**, v. 57, p. 159–171, 2016.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações do café. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 689–694, 2011.

REUTER, W. M. **Analysis of Organic Acid in Fruit Juices by HPLC and UV Detection**. Perkin Elmer, 2015.

REZAZADEH, M.; YAMINI, Y.; SEIDI, S.; ESRAFILI, A. One-way and two-way pulsed electromembrane extraction for trace analysis of amino acids in foods and biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 773, p. 52–59, 2013.

- ROSANDER, A.; CONNOLLY, E.; ROOS, S. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6032–6040, 2008
- SANTOS, C. C. A. A.; LIBECK, B. S.; SCHWAN, R. F. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 32–41, 2014.
- SANTOSO, U.; KUBO, K.; OTA, T.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A. Nutrient composition of *kopyor* coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**, v. 57 (2), p. 299-304, 1996.
- SEOW, C. C.; GWEE, C. N. Coconut milk: chemistry and technology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 189–201, 1997.
- SETHI, S.; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53(9), p. 3408-3423, 2016.
- SINKIEWICZ, G. *Lactobacillus reuteri* in health and disease. Malmö University Health and Society Doctoral Dissertations, Holmbergs – Malmö, 2010.
- SIRIPHANICH, J.; SARADHULDHAT, P.; ROMPHOPHAK, T.; KRISANAPOOK, K.; PATHAVEERAT, S.; TONGCHITPAKDEE, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.), **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**, Vol 3: Cocona to Mango. Woodhead Publishing in Food Science Technology and Nutrition, p. 8–33, 2011.
- SPINLER, J. K.; SONTAKKE, A.; HOLLISTER, E. B.; VENABLE, S. F.; OH, P. L.; BALDERAS, M. A.; SAULNIER, D. M. A.; MISTRETTA, T.; DEVERAJ, S.; WALTER, J.; VERSALOVIC, J.; Highlander, S. K. From prediction to function using evolutionary genomics: Human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 7, p. 1772–1789, 2014.
- TALARICO, T. L.; AXELSSON, L. T.; NOVOTNY, J.; FIUZAT, M.; DOBROGOSZ, W. J. Utilization of Glycerol as a Hydrogen Acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-Propanediol: NAD⁺ Oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56 (4), p. 943-948, 1990.
- TOBAJAS, M.; MOHEDANO, A. F.; CASAS, J. A.; RODRÍGUEZ, J. J. A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO 137 in resting cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 218–225, 2007
- YILDIZ, Fatih. **Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. 451 p.
- ZANNINI, E.; JESKE, S.; LYNCH, K.; ARENDT, E. K. Development of novel quinoa-based yoghurt fermented with dextran producer *Weissella cibaria* MG1. **International Journal of Food Microbiology**, v. 268, n. August 2017, p. 19–26, 2018.
- ZHAO, X.; GÄNZLE, M. G. Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 272, n. 2017, p. 12–21, 2018.

CAPÍTULO 3 Produto funcional à base de leite de coco fermentado com e sem adição de polpa de morango

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver produto fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR 92 em leite de coco na proporção 1:3 (m/v) de polpa de coco maduro em água. A melhor proporção de gomas para promover maior viscosidade e ausência de sinérese do produto foi 0,15% de goma guar (m/v) e 0,05% de goma xantana (m/v). Foram formulados dois produtos, um fermentado à base de leite de coco (FC) e fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango (FCM), com viabilidade de *L. reuteri* $7,98 \pm 0,07$ e $7,98 \pm 0,03$ log UFC/mL para FC e FCM, respectivamente. A viabilidade diminuiu após 30 dias de armazenamento a 4°C até $7,37 \pm 0,08$ log UFC/mL e $6,80 \pm 0,09$ log UFC/mL para FC e FCM, respectivamente. Após simulação gastrointestinal, a taxa de sobrevivência de *L. reuteri* encontrada para FC ($81,63 \pm 0,58\%$) foi maior que a para FCM ($74,17 \pm 1,65\%$). O produto FCM apresentou capacidade antioxidante por radical ABTS•+ e compostos fenólicos totais superior à FC. A presença de fungos e coliformes totais não foi detectada nos produtos prontos e durante o armazenamento. No teste sensorial de aceitação hedônica (total 9 pontos), os produtos obtiveram notas globais $7,54 \pm 1,37$ para FC e $7,74 \pm 1,16$ para FCM, e no teste de escala de atitude (total 7 pontos), notas $5,10 \pm 1,28$ para FC e $5,48 \pm 1,30$ para FCM. Os produtos FC e FCM apresentaram resultados satisfatórios e promissores, indicando que as bebidas à base de leite de coco fermentado são adequadas para desenvolvimento de novos produtos funcionais.

Palavras-chave: Análise sensorial. Capacidade antioxidante. Compostos fenólicos. *Lactobacillus reuteri*. Leite vegetal. Simulação gastrointestinal.

1 Introdução

Os leites vegetais são obtidos através de extração de material vegetal adicionado à água, desintegração e filtração, resultando em um produto semelhante ao leite de vaca em aparência (MÄKINEN et al., 2015). Estas bebidas são produzidas a partir de oleaginosas, cereais ou leguminosas, sendo as mais comuns à base de soja, amêndoa, arroz, coco e quinoa (IFT, 2015).

No ano de 2017, 9,3 % da venda total de leite foi composta por leites vegetais, com arrecadação de aproximadamente 1,5 bilhões de dólares nos Estados Unidos. Já o consumo de iogurtes à base de leites vegetais mostrou crescimento de 56% em relação ao ano de 2016 (NIELSEN, 2017). Os leites vegetais não são substitutos dos produtos lácteos, pois diferem no teor de proteínas e outros nutrientes (MÄKINEN et al., 2015), porém estes produtos podem oferecer alternativas ou complementos aos consumidores vegetarianos, veganos, indivíduos que têm alergias e restrições alimentares.

O leite de coco pode ser consumido na forma de bebida quando a polpa de coco maduro é misturada à água, resultando em uma suspensão vegetal. A separação física da emulsão óleo em água do leite de coco não é desejável após processamento e armazenamento (SEOW; GWEE, 1997). Por isso, pesquisas são necessárias para superar problemas de estabilidade de emulsão, textura, nutrientes e sensoriais (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016; JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Uma forma de aumentar o valor nutricional de leites vegetais é a incorporação de microrganismos benéficos à microbiota humana aliada à adição de polpa de frutas para melhorar o aporte de nutrientes e sabor dos produtos (BEDANI et al., 2014).

As bebidas probióticas não lácteas devem possuir microrganismos capazes de crescer na matriz e sobreviver durante o armazenamento e em condições gastrointestinais. Além disso, a análise sensorial é de extrema importância porque está relacionada à qualidade do produto, características do processamento e aceitabilidade dos consumidores (SHORI, 2015). O desenvolvimento destas novas bebidas é desafiador, visto que os consumidores esperam receber produtos nutritivos, saborosos e com propriedades benéficas, quando regularmente consumidos (GRANATO et al., 2010).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar dois produtos à base de leite de coco fermentados por *Lactobacillus reuteri* LR 92 com e sem adição de polpa de morango em relação à sobrevivência do microrganismo após simulação gastrointestinal, determinar durante o armazenamento a viabilidade, cor, viscosidade, o perfil de açúcares e ácidos orgânicos, a capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais, além de avaliar sensorialmente a aceitação dos produtos.

2 Material e Métodos

2.1 MICRORGANISMO E DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

2.1.1 Microrganismo *L. reuteri* LR 92

Para a fermentação do leite de coco foi utilizada cultura comercial liofilizada composta da linhagem *Lactobacillus reuteri* LR 92 (DSM 26866, Sacco, Itália). O conteúdo de 0,01% (m/v) do pó liofilizado contendo a linhagem foi ressuspenso em leite de coco 1:3 (m/v) pasteurizado, contendo 20% (v/v) de glicerol estéril e mantido congelado. No momento do uso, foi obtido o pré-inóculo através de duas ativações (1% v/v) em leite de coco a 37 °C por 24 horas.

2.1.2 Determinações microbiológicas

Para a contagem de bactérias lácticas, foram feitas diluições decimais do fermentado em água peptonada 0,1% (m/v) estéril e distribuídas em profundidade de ágar MRS seguido de incubação a 37 °C por 72 horas em jarras com placas geradoras de anaerobiose.

2.2 LEITE DE COCO FERMENTADO

A polpa de coco maduro foi adquirida do comércio local de Londrina - PR, Brasil. O endosperma de coco foi triturado com água destilada a 70 °C na proporção 1:3 (m/v) em um processador de alimentos para uso doméstico (Philips Walita, Brasil) durante 2 minutos. A suspensão foi filtrada em coador de tecido sintético e os

resíduos sólidos foram descartados. Após a obtenção do leite de coco, foi realizada a pasteurização a 95 °C por 5 min (SIRIPHANICH et al., 2011).

Após resfriamento em banho de gelo até 37 °C, foi adicionado 1% (v/v) do pré inóculo ativado no leite de coco e a fermentação foi conduzida a 37 °C por 14 horas, até pH $4,5 \pm 0,1$.

2.3 TESTE DE ADIÇÃO DE GOMAS

Foram analisadas 5 formulações com total de 0,2 % (m/v) de mistura de goma xantana (Xinjiang Fufeng Biotechnologies Co. Ltd, China – Anexo B) e goma guar (Durga Enterprises, India – Anexo C) adicionadas à formulação base (PAQUIN, 2009). O teste teve a finalidade de estabelecer a maior viscosidade (centipoise) e menor sinérese do produto fermentado (cm).

A formulação base foi determinada a partir de testes preliminares, e consistiu em: 8 % (m/v) de açúcar refinado (União®, Camil Alimentos, Brasil), 20 % (v/v) de água e 72% (v/v) de leite de coco fermentado por *L. reuteri* LR 92 durante 14 horas a 37 °C, com valor final de pH $4,5 \pm 0,1$. A goma xantana, goma guar e açúcar cristal foram dispersos em água destilada e a mistura foi pasteurizada a 80 °C por 1 minuto. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada em agitador Turratec TE-102 (Tecnal, Brasil) a 10.000 rpm por 1 minuto.

2.3.1 Viscosidade

As amostras foram acondicionadas em béquer e mantidas à 4 °C por 12 horas após homogeneização. Foi utilizado o volume de 300 mL da amostra para análise e o aparelho utilizado foi o viscosímetro digital Brookfield, com spindle 4, velocidade de 12 rpm (BAÚ; GARCIA; IDA, 2013). Os resultados foram expressos em centipoise, que corresponde a 10^{-3} Pa·s (SI).

2.3.2 Sinérese

A sinérese dos produtos fermentados adicionados de goma foi analisada através de centrifugação. O método utilizado para centrifugação foi o descrito por Gauche et al. (2009), com modificações. 10 mL da amostra foram centrifugados sob

refrigeração (4 °C) a 350 xg por 10 minutos. A separação de fases da emulsão foi medida com régua e o resultado expresso em centímetros.

2.4 PREPARO DOS PRODUTOS FERMENTADOS

Os produtos fermentados de coco (FC) e fermentado de coco com morango (FCM) foram preparados de acordo com a Tabela 1. Foi utilizada a polpa de morango (Polpa Norte, Brasil) para o produto FCM, ou água destilada para o produto FC, adicionados na proporção de 20 % (m/v) de volume final. A goma xantana (Xinjiang Fufeng Biotechnologies Co. Ltd, China), goma guar (Durga Enterprises, India) grau alimentício e açúcar cristal (União®, Camil Alimentos, Brasil) foram dispersos na polpa de morango (FCM) ou na água destilada (FC) e a mistura foi pasteurizada a 80 °C por 1 min.

Os preparados pasteurizados foram resfriados em banho de gelo até 37 °C e adicionados ao leite de coco fermentado. As essências de coco ou morango (Arcolor, Brasil) foram adicionadas e a mistura foi homogeneizada em agitador Turrtec TE-102 (Tecnal, Brasil) a 10.000 rpm por 1 minuto. Os produtos prontos foram acondicionados em frascos de vidro de 300 mL em triplicata e mantidos a 4 °C por 30 dias.

Tabela 1 – Composição dos produtos fermentados sabor coco e sabor coco com morango em 100 mL de produto

Ingredientes (g/100mL) de produto	Produtos	
	FC	FCM
Açúcar cristal	8,00	8,00
Polpa de morango	0,00	20,00
Água destilada	20,00	0,00
Goma Xantana**	0,15	0,15
Goma Guar**	0,05	0,05
Leite de coco fermentado*	72,00	72,00
Essência de coco	0,05	0,00
Essência de morango	0,00	0,05

*contendo aproximadamente 8 log UFC/mL da linhagem *L. reuteri* LR 92;

** concentrações de goma guar e goma xantana estabelecidas conforme item 2.3;

FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango

2.5 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DETERMINAÇÃO DO PH

O leite de coco (1:3 m/v) e produtos fermentados foram caracterizados por análises físico-químicas através da determinação da porcentagem de proteínas, minerais, lipídeos, umidade e cinzas, por métodos descritos pela AOAC (2006) e o teor de carboidratos foi obtido por diferença. Os valores do pH das amostras foram determinados utilizando-se o potenciômetro digital de bancada (Kasvi K39-2014B).

2.6 ANÁLISES DOS PRODUTOS NO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

Análises de pH, viscosidade, açúcares e ácidos orgânicos, viabilidade celular, fungos, coliformes totais, cor, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por radical ABTS•+ foram conduzidas nos produtos FC e FCM nos tempos 1, 15 e 30 dias do armazenamento a 4 °C.

2.6.1 Determinação de Açúcares e Ácidos Orgânicos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

2.6.1.1 Preparo das amostras

Foi homogeneizado 1 mL de amostra em 4 mL de água ultra pura (Mili-Q®). Em seguida, as amostras foram centrifugadas em ultra centrífuga (HITACHI, Ibaraki, Japão) a 230600 xg durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno) 0,22 µm (Millex®) para resultar em amostra para determinações de açúcares e ácidos orgânicos. As soluções padrões de glicose, frutose e sacarose (pureza >99% para CLAE, Sigma-Aldrich) foram preparadas em água ultrapura em concentração de 2 mg/mL, assim como as soluções padrões de ácido málico, cítrico, acético e succínico (pureza > 98% para CLAE, Sigma-Aldrich).

2.6.1.2 Determinação de Açúcares e Ácidos orgânicos

Para a determinação de glicose, frutose e sacarose, foi utilizada a água ultra pura como fase móvel. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu LC 20 (Shimadzu corp., Kyoto, Japão) composto por bomba de alta pressão (LC-20AT), injetor automático (SIL-20AC HT) com volume de injeção ajustado para 20 μ L, detector por índice de refração (RID-10A), forno de coluna (CTO-20A) mantido à temperatura constante de 85 °C, módulo de controle (CBM-20A) e coluna de troca iônica Aminex HPX-87P (7,8x300mm na forma iônica Pb^{+2} , Biorad, CA, EUA).

A determinação dos ácidos málico, láctico, cítrico, succínico e acético foi conduzida no mesmo cromatógrafo que a determinação de açúcares. A coluna cromatográfica utilizada foi Shiseido CapCell Pak 5 μ C18, MG 250 x 4,6 mm. Como fase móvel foi usada uma solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,4, na vazão de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C e o volume de injeção em 20 μ L. A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores de índice de Refração (RID-10A) e arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), em comprimento de onda 215 nm e modo de varredura de 200 a 400 nm. O processamento dos dados foi realizado utilizando-se o Software Shimadzu LC Solutions (PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011).

2.6.2 Análise de Cor

A análise da cor dos produtos fermentados foi feita utilizando-se colorímetro portátil (Minolta CR-10, Osaka, Japão), com o iluminante CIE D65 e escala de cor CIE $L^*a^*b^*$, sendo a coordenada “L” a luminosidade; a coordenada “a” a intensidade vermelho/verde e a coordenada “b” a intensidade do amarelo/azul.

2.6.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante

Para determinação de compostos fenólicos totais nos produtos, foi utilizada metodologia descrita por Swain e Hills (1959), utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 mL de amostra (mg EAG/ 100 mL).

A capacidade de sequestrar radical livre ABTS+ (2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sanches-González et al. (2005). Os resultados foram expressos em μmol equivalentes de Trolox por mililitro de amostra (μmol Trolox/mL).

2.6.4 Determinação de fungos e coliformes totais

Para a determinação de fungos, foram feitas diluições decimais do fermentado em água peptonada 0,1% (m/v) estéril distribuídas em profundidade de Agar Batata Dextrose (Acumedia). A leitura dos resultados foi feita após 5 dias de incubação a 25 °C (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

Para a determinação de Coliformes totais utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos pelo número mais provável (NMP). Foram feitas diluições decimais do fermentado em água peptonada 0,1% (m/v) estéril e incubou-se em Caldo Lauril Sulfato (Himedia) a 35°C durante 24 a 48 horas. (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). As análises de fungos e coliformes totais foram feitas em triplicata das 3 últimas diluições seriadas (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}).

2.7 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL

A resistência de *L. reuteri* nos produtos fermentados foi testada em simulação gástrica e entérica *in vitro*. O procedimento foi conduzido segundo Bedani et al. (2014). Para verificar a tolerância do *L. reuteri* em meio ácido no produto fermentado, 10 mL de cada diluição do produto em 0,85 g/100 mL de NaCl foram transferidos para 3 frascos estéreis e o pH foi ajustado para 2,3-2,6, com 1 mol equi/L de HCl (Merck). Soluções contendo as enzimas pepsina e lipase (Sigma-Aldrich) foram adicionadas às amostras até atingir a concentração de 3 g/L e 0,9 mg/L, respectivamente. Os tubos foram incubados em banho maria digital (Novatecnica, Brasil) a 37 °C sob agitação de 150 rpm durante 2 horas (simulação da fase gástrica I).

No próximo passo, o pH das amostras foi elevado a 5,4 - 5,7 utilizando-se uma solução alcalina (150 mL de 1 mol equi/L NaOH (Synth), 14 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Synth) e 1 L de água destilada). A bile (Sigma-Aldrich) e pancreatina (Sigma-Aldrich) foram adicionadas para atingir a concentração de 10 g/L

e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37°C por 2 horas sob agitação, levando à simulação entérica fase 1. Na segunda fase, o pH foi aumentado para 6,8 - 7,2 usando-se a mesma solução alcalina, bile e pancreatina e foi ajustado para manter a concentração de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. Todas as amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação, levando à simulação entérica fase 2 e totalizando 6 h de experimento.

A contagem de *L. reuteri* foi realizada em alíquotas recolhidas a partir de amostras em triplicata, após 2, 4 e 6 h, utilizando-se meio seletivo. Os resultados de sobrevivência aos sucos gastrointestinais foram expressos como log UFC/g. A fim de avaliar o efeito do tempo de armazenamento na sobrevivência do probiótico sob condições gastrointestinais simuladas, a taxa de sobrevivência foi calculada de acordo com a seguinte equação (GUO et al.,2009):

$$\text{Taxa de sobrevivência} = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100$$

Na qual N_1 é a contagem total de *L. reuteri* viável após exposição às condições de simulação gastrointestinal *in vitro* (6 h) e N_0 é a contagem total de *L. reuteri* antes da exposição às condições de simulação gastrointestinal *in vitro*.

2.8 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, com parecer nº 2077222 (Anexo D). Para todas as amostras foi assegurada a inocuidade e a garantia de ausência dos patógenos *Salmonella* sp. e coliformes totais, de acordo com os critérios higiênico-sanitários brasileiros estabelecidos na RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). A avaliação sensorial de FC e FCM no dia 1 de armazenamento foi realizada em cabines individuais, com luz branca. As amostras foram servidas em quantidades padronizadas de 30 mL (Apêndice A), refrigeradas a 8 ± 2 °C e codificadas com números aleatórios de três dígitos. Todos os 105 participantes foram devidamente esclarecidos, assinaram termo de consentimento livre para sua participação (Anexo E), e responderam ao questionário sobre coleta de dados do provador (Anexo F).

Os produtos fermentados foram avaliados nos testes sensoriais de escala hedônica de 9 pontos (Anexo G) e escala de atitude ou de intenção de 7 pontos (Anexo H) (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparação de médias ao nível de 5% de significância, empregando-se o programa STATISTICA 8.0. Os gráficos foram desenvolvidos no GraphPad Prism 5.

3 Resultados e discussão

3.1 TESTE DE ADIÇÃO DE GOMAS

Os resultados de viscosidade e sinérese para 5 proporções de goma guar e goma xantana estão apresentados na Tabela 2. Apenas as formulações T1 e T4 resultaram em ausência de sinérese após a centrifugação. O valor de viscosidade diferiu significativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo a formulação T4, com 0,15% de goma xantana e 0,05% de goma guar, a que apresentou maior resposta de viscosidade.

Tabela 2 – Formulações utilizadas no teste de adição de goma xantana e goma guar à formulação base, com total de 0,2% de gomas.

Formulações	Adição de gomas		Respostas	
	Goma Xantana (% m/v)	Goma Guar (% m/v)	Viscosidade (centipoise)	Sinérese por centrifugação (cm)
T1	0,20	0,00	391,02 ^b ± 5,73	0,00
T2	0,00	0,20	81,68 ^d ± 1,61	3,85 ± 0,21
T3	0,10	0,10	235,91 ^c ± 1,91	1,85 ± 0,21
T4	0,15	0,05	480,20 ^a ± 4,21	0,00
T5	0,05	0,15	75,79 ^e ± 1,13	1,25 ± 0,07

*Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$).

A menor viscosidade dos tratamentos contendo maiores concentrações de goma de guar (T2 e T5) pode ter ocorrido devido à hidrólise parcial desta goma na matriz ou à diminuição da interação molecular entre a goma e a água, já que a predominância de íons H⁺ no meio ácido pode diminuir a interação das moléculas

de goma guar e água por pontes de hidrogênio (WANG; ELLIS; ROSS-MURPHY, 2000). Dessa forma, a maior sinérese foi observada na formulação T2, que continha exclusivamente goma de guar.

A proporção de gomas de T4 evidenciou um comportamento sinérgico das gomas guar e xantana, que exibem aumento da viscosidade de soluções em comparação à observada quando as gomas são adicionadas separadamente. A interação sinérgica sofre influência da proporção de gomas e temperatura de dissolução empregada (CASAS; MOHEDANO; GARCIA-OCHOA, 2000). Por isso, a formulação T4 foi escolhida para desenvolvimento dos produtos à base de leite de coco fermentado.

3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A Tabela 3 mostra os valores de composição centesimal e pH do leite de coco não fermentado (LC) e dos produtos fermentados de coco (FC) e fermentado de coco com adição de polpa de morango (FCM).

Pode-se observar que houve diferença entre os produtos formulados e a matéria prima (LC) em relação ao teor de umidade, proteínas, lipídios e carboidratos, principalmente devido à adição de açúcar cristal (8 % m/v), gomas guar e xantana (0,2 % m/v) e polpa de morango ou água (20 % m/v) aos produtos. Desse modo, os produtos FC e FCM apresentaram menor teor de umidade e lipídios e maior teor de carboidratos comparados à LC.

Tabela 3 – Composição centesimal de leite de coco (LC), produto à base de leite de coco fermentado (FC) e produto à base de leite de coco fermentado com adição de polpa de morango (FCM)

Amostra	Umidade (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)	Carboidratos por diferença (%)	pH
LC	90,97 ^a (±0,30)	0,34 ^a (±0,01)	8,32 ^a (±0,33)	0,06 ^a (±0,1)	0,31	6,42 ^a (±0,08)
FC	84,75 ^b (±0,02)	0,28 ^b (±0,02)	6,65 ^b (±0,35)	0,09 ^a (±0,02)	8,26	4,55 ^b (±0,02)
FM	84,27 ^b (±0,04)	0,32 ^a (±0,01)	6,30 ^b (±0,80)	0,11 ^a (±0,05)	9,00	4,02 ^c (±0,03)

*Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$); LC: leite de coco não fermentado (1:3 m/v); FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango

O conteúdo de proteínas não diferiu entre FM e LC, porém, foi menor em FC. Isso pode ter ocorrido devido à adição de 20 % (m/v) de água à FC, enquanto que em FCM, foi adicionado 20 % (m/v) de polpa de morango, que apresentou quantidades mínimas de proteínas. O teor de cinzas não apresentou diferença significativa nas amostras analisadas.

O leite de coco utilizado no presente trabalho apresentou 8,32 % de lipídios devido à diluição feita (1:3 m/v) e à forma de obtenção durante o processamento. Em leites de coco não diluídos, a composição de lipídios totais variou entre 32,2 e 40 %. Já em leites de coco comerciais, a composição de lipídios encontrada foi menor, variando entre 11 e 18,4 % (SEOW; GWEE, 1997).

O pH do leite de coco (1/3 m/v) não fermentado (LC) apresentou valor próximo ao encontrado em leites de coco comerciais. O leite de coco da Tailândia apresentou pH 6,2 e da Samoa, pH 6,3 (SEOW; GWEE, 1997). No produto FC, o pH encontrado logo após a formulação foi 4,55, o que significa que após a adição dos componentes, o pH se manteve em $4,5 \pm 0,1$. Por outro lado, FCM apresentou diminuição do pH devido à adição da polpa de morango (20 % m/v), que contém ácido cítrico (item 3.3.2).

3.3 ANÁLISES DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

3.3.1 pH

Os valores de pH, viscosidade açúcares e ácidos orgânicos para FC e FCM durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento refrigerado estão apresentados na Tabela 4.

A polpa de morango utilizada no presente trabalho promoveu redução do pH do leite de coco fermentado $4,5 \pm 0,1$ para $4,04 \pm 0,08$. Apesar disso, os valores de pH se mantiveram constantes ao longo do armazenamento. Similarmente, Jaster et al. (2018) observaram que a adição de polpa de morango a iogurte ocasionou redução significativa do pH e consequente aumento de acidez. Os valores de pH de FC também não diferiram durante o armazenamento, sugerindo uma estabilidade de pH na vida de prateleira.

3.3.2 Açúcares e ácidos orgânicos

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que os FC e FCM exibiram perfis diferentes de açúcares e ácidos orgânicos em 1, 15 e 30 dias do armazenamento. A formulação FCM apresentou maiores quantidades iniciais de glicose, frutose, ácido málico e ácido cítrico devido à presença natural destes compostos na polpa de morango adicionada.

O teor de sacarose diminuiu em FC e FCM ao longo de 30 dias, porém *L. reuteri* apresentou consumo mais significativo em FCM. A redução em FC foi cerca de 16,15 %, contra 23,25 % em FCM. Isso significa que as bactérias permaneceram viáveis nos produtos, sendo capazes de hidrolisar a molécula de sacarose em frutose e glicose. Pode-se observar o aumento pronunciado do teor de glicose e frutose em FCM entre 15 e 30 dias de armazenamento, indicando que a taxa de hidrólise foi maior que o consumo dos açúcares. O produto FC não apresentou diferença significativa nos teores de frutose e glicose até 30 dias e pode-se afirmar que houve hidrólise e consumo simultâneo dos açúcares redutores nesta amostra.

A produção de ácido láctico aumentou em FC ao final de 30 dias, apresentando valor de 1,10 g/L, enquanto FCM apresentou valor de 0,51 g/L. Pode-se observar que também houve aumento de ácido acético em ambos os produtos. A produção de ácidos durante o armazenamento foi decorrente da degradação de açúcares por *L. reuteri*, através da via da fosfoquetolases. Neste processo utilizado pelas bactérias heterofermentativas, há produção de dióxido de carbono, etanol, ácido láctico e acético (ÅRSKÖLD et al., 2008).

Pereira et al. (2013) produziram suco de caju fermentado por *Lactobacillus casei* NRRL B-442 e detectaram durante o armazenamento (4 °C por 42 dias) uma redução do teor de sacarose, frutose e glicose. Esta redução foi decorrente do crescimento de *L. casei* e fermentação de açúcares durante o armazenamento.

No presente trabalho, *L. reuteri* não foi capaz de aumentar a viabilidade celular após armazenamento (item 3.3.4). Contudo, a bactéria hidrolisou a sacarose, resultando em acúmulo de frutose e glicose nos produtos. Segundo Langa et al. (2013), *L. reuteri* apresenta sensibilidade à temperatura de armazenamento refrigerado, que pode acelerar a morte celular. Com isso, há comprometimento da utilização de açúcares e produção de ácidos orgânicos pelas células viáveis no meio.

Tabela 4 – Valor de pH, viscosidade, açúcares e ácidos orgânicos de produtos à base de leite de coco fermentado durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C.

Amostra	Tempo (dias)	pH	Viscosidade (centipoise)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Ácido málico (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido cítrico (g/L)	Ácido succínico (g/L)
	1	4,53 ^a ±0,07	480,9 ^c ±19,80	107,70 ^a ±0,38	1,41 ^d ±0,08	0,85 ^c ±0,06	0,05 ^b ±0,001	0,29 ^{d,e} ±0,010	0,26 ^d ±0,004	0,06 ^b ±0,001	0,13 ^c ±0,002
FC	15	4,45 ^a ±0,01	285,9 ^e ±1,60	98,70 ^b ±0,35	1,65 ^d ±0,10	0,71 ^c ±0,05	0,05 ^b ±0,001	0,31 ^d ±0,014	0,34 ^c ±0,006	0,06 ^b ±0,001	0,15 ^{b,c} ±0,001
	30	4,43 ^a ±0,01	243,73 ^f ±3,15	90,31 ^c ±0,57	4,21 ^d ±0,15	3,88 ^c ±0,29	0,05 ^b ±0,003	1,10 ^a ±0,009	0,67 ^a ±0,045	0,05 ^b ±0,001	0,19 ^a ±0,031
	1	4,04 ^b ±0,08	701,0 ^a ±3,98	106,9 ^a ±0,42	29,1 ^c ±1,71	18,89 ^b ±1,41	0,10 ^a ±0,013	0,25 ^e ±0,005	0,26 ^d ±0,005	1,20 ^a ±0,076	0,14 ^{b,c} ±0,002
FCM	15	3,96 ^b ±0,02	525,0 ^b ±1,60	97,51 ^b ±0,34	38,78 ^b ±2,28	23,29 ^b ±1,73	0,09 ^a ±0,005	0,42 ^c ±0,005	0,36 ^c ±0,008	1,28 ^a ±0,023	0,16 ^{a,b,c} ±0,001
	30	3,97 ^b ±0,02	425,73 ^d ±2,77	82,05 ^d ±0,29	70,12 ^a ±4,12	41,49 ^a ±3,09	0,05 ^b ±0,001	0,51 ^b ±0,020	0,45 ^b ±0,018	1,30 ^a ±0,186	0,18 ^{a,b} ±0,029

Resultados apresentados em cálculo médio de três repetições. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$). FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango

3.3.3 Viscosidade

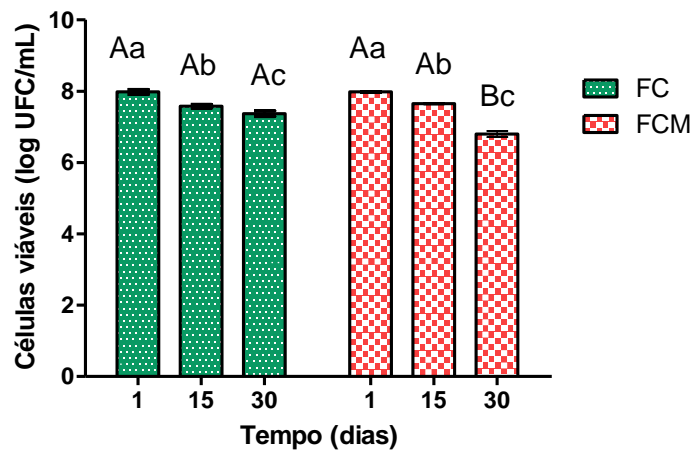
Os dados da Tabela 4 mostram que FCM apresentou maior viscosidade inicial ($701,0 \pm 3,98$ centipoise) quando comparado ao FC ($480,9 \pm 19,80$ centipoise). Isso se deve à presença de partículas da polpa de morango, que pode ter influenciado no aumento de viscosidade do produto, já que a goma xantana mantém em suspensão estas partículas presentes em polpa de frutas (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017).

Pode-se observar que tanto para FC como para FCM, a viscosidade diminuiu significativamente ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento, fato que pode ser atribuído à ocorrência de hidrólise parcial da goma guar e diminuição da interação entre as gomas e a água. Em condições ácidas, a goma guar pode permanecer estável ou ser parcialmente hidrolisada, produzindo uma mistura de monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (WANG; ELLIS; ROSS-MURPHY, 2000). Por ser uma galactomanana, os monossacarídeos presentes na goma guar são a manose e galactose (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2014). Wang, Ellis e Ross-Murphy (2000) encontraram que a diminuição de viscosidade em soluções ácidas não foi devida à degradação da galactomanana, mas causada por uma mudança na estrutura da água, diminuindo a interação das moléculas por ligação de hidrogênio. A goma xantana geralmente apresenta maior estabilidade de viscosidade na presença de ácidos orgânicos e em faixa de pH de 1 a 12 (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017).

3.3.4 Viabilidade de *L. reuteri* LR 92

A Figura 1 apresenta a viabilidade de *L. reuteri* LR 92 nos produtos FC e FCM durante o armazenamento refrigerado. Foi observada maior redução na viabilidade final de FCM ($1,18$ log UFC/mL) quando comparado a FC ($0,61$ log UFC/mL) ao final de 30 dias. O produto FC apresentou contagem inicial de células viáveis $7,98 \pm 0,07$ log UFC/mL, reduzindo até atingir $7,37 \pm 0,08$ log UFC/mL, ao final do período. Por outro lado, FM apresentou contagens de $7,98 \pm 0,03$, reduzindo até $6,80 \pm 0,09$ log UFC/mL.

Figura 1 – Contagem de células viáveis de *L. reuteri* LR 92 em produto à base de leite de coco fermentado (FC) e produto à base de leite de coco fermentado com adição de polpa de morango (FCM) durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C.



Resultados apresentados em cálculo médio de três repetições. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas para a mesma formulação ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre o mesmo tempo de amostragem ($p < 0,05$); FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango

Vários fatores podem interferir na viabilidade das bactérias durante o armazenamento, como a sensibilidade às temperaturas de refrigeração, ao baixo pH, à acidificação e potencial de óxido redução do meio, ou presença de compostos inibidores naturais (LANGA et al., 2013; VINDEROLA, 2002).

Nualkaekul e Charalampopoulos (2011) observaram que em suco de romã, a diminuição da viabilidade de *Lactobacillus plantarum* pode ser sido decorrente da presença de compostos antimicrobianos naturais da fruta, como os compostos fenólicos. Isso porque ao analisarem diversos sucos de fruta como veículos para o probiótico (laranja, groselha, abacaxi, toranja, romã, cranberry e limão), os autores concluíram que o pH baixo não influenciou na morte celular.

Vinderola et al. (2002) relataram que suco natural de morango inibiu linhagens de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* CNRZ 1881, *Bifidobacterium longum* A1 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* através da técnica de difusão em ágar, e com isso, mostrou a maior capacidade inibitória dentre os sucos testados.

Por outro lado, ao adicionar polpa de morango a iogurte, Jaster et al. (2018) constataram que não houve redução de viabilidade das bactérias lácticas (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) após 7 dias de armazenamento a 5 °C.

Não se pode afirmar que a perda de viabilidade de FCM foi decorrente da diminuição do pH pela adição de polpa de morango ao produto. Entretanto, foi observado neste trabalho que produtos de morango apresentam maior atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais (item 3.3.5), que podem explicar a redução da viabilidade.

A presença de açúcares nas duas formulações também pode ter interferido na viabilidade das bactérias. Costa et al. (2013) desenvolveram uma bebida de melão fermentado por *Lactobacillus casei* e observaram que a amostra sem adição de sacarose apresentou viabilidade de 6,03 log UFC/mL, enquanto que a amostra que continha 10 % (m/v) de sacarose apresentou viabilidade de 4,77 log UFC/mL após 42 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C.

Os produtos probióticos devem ter uma concentração mínima de culturas vivas e ativas de 10^6 UFC/mL ou grama e um total de 10^9 UFC de probiótico deve estar presente na porção do produto no momento do consumo (KECHAGIA et al., 2013; HILL et al., 2014). Tendo em vista os resultados obtidos, FC e FCM estão de acordo com as contagens mínimas adequadas para presença de culturas vivas e ativas.

A presença de fungos filamentosos, leveduras e coliformes totais não foi detectada tanto nos produtos prontos quanto durante o armazenamento refrigerado, indicando que os produtos não oferecem riscos à saúde dos consumidores.

3.3.5 Compostos Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por radical ABTS•+ em leite de coco e produtos à base de leite de coco fermentado. O teor de fenólicos totais e capacidade de sequestrar o radical ABTS•+ de FC e LC não diferiram entre si, indicando que apesar da adição de açúcar, gomas, essência e do processamento do produto FC, a capacidade antioxidante foi preservada.

É possível observar também que os valores obtidos para FC não diferiram ao longo do armazenamento de 30 dias. Com isso, o produto mostrou uma característica positiva, já que o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante não foram prejudicados pelo armazenamento refrigerado.

Tabela 5 – Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de leite de coco (LC) e produtos à base de leite de coco fermentado (FC e FCM) durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C

Amostra	Tempo (dias)	Fenólicos Totais (mg EAG/100 mL)	ABTS (µmol Trolox/mL)
LC	1	6,46 ^c ± 0,04	0,97 ^c ± 0,03
	1	4,05 ^c ± 0,10	0,80 ^c ± 0,01
FC	15	4,09 ^c ± 0,07	0,82 ^c ± 0,13
	30	4,08 ^c ± 0,02	0,84 ^c ± 0,01
	1	29,37 ^a ± 0,63	2,33 ^a ± 0,02
FCM	15	22,07 ^b ± 0,48	1,40 ^b ± 0,23
	30	20,21 ^b ± 2,45	0,97 ^c ± ,003

Resultados apresentados em cálculo médio de três repetições. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$). FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango.

Ochoa-Velasco, Cruz-González e Guerrero-Beltrán (2014) encontraram em leite de coco 2:1 (m/v) valores de capacidade antioxidante por radical ABTS•+ entre 10 e 15 mg de Trolox/100 mL. Os compostos fenólicos totais apresentaram valores entre 25 e 35 mg EAG/100 mL. É importante ressaltar que os autores reportaram não haver perda de capacidade antioxidante mesmo após o tratamento térmico. Resultado bem próximo foi encontrado em leite de coco indiano, com teor de compostos fenólicos totais $31 \pm 4,9$ mg EAG/100 g de produto (SREERAMULU; RAGHUNATH, 2011).

Neste trabalho, os valores encontrados para FC e LC estão muito abaixo dos encontrados pelos trabalhos citados devido à diluição feita, método de processamento e à incorporação do leite de coco fermentado aos demais ingredientes da formulação FC.

Quanto ao produto FCM, pode-se perceber que o maior teor de compostos fenólicos totais ($29,37 \pm 0,63$ mg EAG/100 mL) e capacidade de sequestrar o radical ABTS•+ ($2,33 \pm 0,02$ µmol Trolox/mL) foram observados no primeiro dia de armazenamento. Após 15 dias houve degradação dos compostos fenólicos

presentes em FCM, porém o mesmo valor foi mantido até o final de 30 dias. A capacidade antioxidante por radical ABTS•+ apresentou diminuição progressiva até os 30 dias do armazenamento.

Em iogurte com adição de morango, após armazenamento a 2 °C por 28 dias foi observada diminuição de 35% da capacidade antioxidante pelo método ABTS. Após 24 horas da adição, foi observada diminuição de 14% no teor de fenólicos totais (OLIVEIRA et al., 2015).

Como citado anteriormente neste trabalho, a presença de compostos fenólicos pode diminuir a sobrevivência de bactérias lácticas no armazenamento de sucos (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). Os resultados obtidos para FCM mostram que o teor de compostos fenólicos foi maior devido à presença de polpa de morango e apesar da degradação após 15 dias, os teores apresentados podem ter influenciado a diminuição da viabilidade durante o armazenamento.

3.3.6 Cor

A análise dos parâmetros de cor das bebidas FC e FCM evidenciou diferenças nas amostras (Tabela 6). Durante o armazenamento, o parâmetro L*(0 = preto e 100 = branco) mostrou que a amostra FC era a mais clara, mas apresentou diminuição significativa da luminosidade após 30 dias. A amostra FCM apresentou diminuição da luminosidade em 15 dias, porém não diferiu significativamente até 30 dias.

O parâmetro a* da bebida FC apresentou valores mais próximos ao verde (a* negativo) com diminuição na intensidade da cor após 30 dias. Em relação ao parâmetro b*, houve uma tendência ao azul (b* negativo) e a cor não diferiu durante todo o período. Ochoa-Velasco, Cruz-González e Guerrero-Beltrán (2014) encontraram valores de cor diferentes para leite de coco após processamento térmico a 72 °C por 18 segundos. Os valores encontrados foram: 77,4 para L*, -0,7 para a* e 2,0 para b*. Estes resultados diferem devido a muitos fatores, como a temperatura de tratamento térmico utilizada neste trabalho, diluição 1:3 (m/v), fermentação, adição de gomas e açúcar cristal a FC.

Tabela 6 – Valores L*, a* e b* de produtos à base de leite de coco fermentado por *L. reuteri* LR 92 durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C.

Tratamentos	Tempo (dias)	L*	a*	b*
FC	1	73,54 ^a ± 1,63	-0,70 ^d ± 0,02	-0,93 ^d ± 0,06
	15	66,65 ^b ± 0,14	-0,71 ^d ± 0,02	-0,91 ^d ± 0,01
	30	62,84 ^c ± 2,91	-0,66 ^e ± 0,02	-0,96 ^d ± 0,07
FCM	1	55,77 ^d ± 0,82	9,85 ^a ± 0,20	4,71 ^c ± 0,09
	15	51,74 ^e ± 0,68	8,68 ^b ± 0,03	6,77 ^b ± 0,02
	30	54,52 ^e ± 1,70	8,15 ^c ± 0,23	7,29 ^a ± 0,17

Resultados apresentados em cálculo médio de três repetições. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$); FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango.

Em FCM, à medida que a cor vermelha (a* positivo) diminuiu ao longo do armazenamento, a cor amarela (b* positivo) se intensificou. A mudança de cor pode ser causada por reações oxidativas e não oxidativas complexas, aceleradas em contato com oxigênio no recipiente de armazenamento (BUVÉ et al., 2018). A cor natural de suco de morango é deteriorada facilmente, podendo ser influenciada pelo pH, temperatura, processamento térmico, armazenamento, embalagem e exposição à luz. Em produtos de morango, é comum a cor vermelha ser substituída pela marrom devido à degradação de antocianinas causada por oxidação ou outras reações químicas (WANG; ZHANG; WU, 2015).

Este comportamento apontou características desfavoráveis em FCM durante o armazenamento e, por isso, alternativas devem ser buscadas a fim de melhorar a estabilidade dos produtos, como a mudança do material de embalagem utilizado para acondicionamento, de modo a diminuir o contato com o ar e recipientes que não permitam exposição à luz.

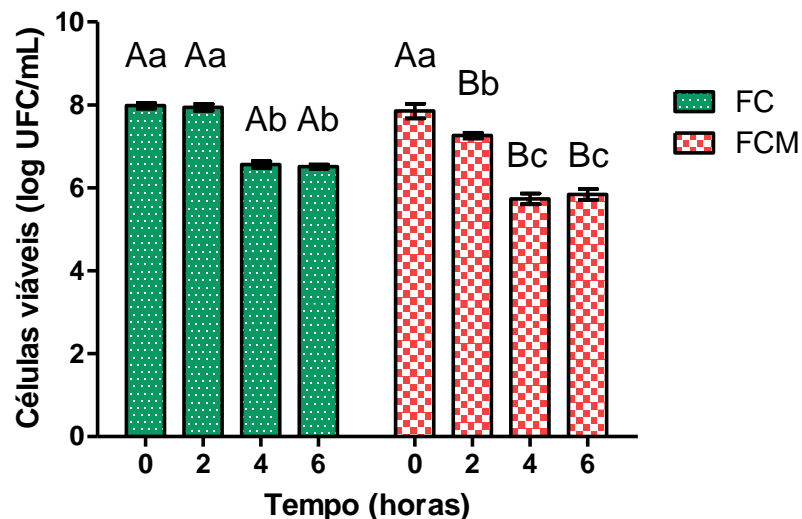
3.4 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL

A sobrevivência *L. reuteri* LR 92 contido nos produtos fermentados de coco (FC) e coco com morango (FCM) expostos à simulação gastrointestinal *in vitro* está apresentada na Figura 2.

A contagem de células inicial foi $7,98 \pm 0,07$ e $7,85 \pm 0,18$ log UFC/mL para FC e FCM, respectivamente, não diferindo entre si ($p < 0,05$). Após 2 horas de

simulação da fase gástrica, houve diminuição de contagens em FCM, enquanto FC manteve o número inicial de células. Ao final da fase entérica I (4 h) foi observada a maior redução de contagens para os dois produtos analisados, com diminuição superior em FCM ($5,73 \pm 0,13$ log UFC/mL) quando comparado ao FC ($6,56 \pm 0,08$ log UFC/mL). Entretanto, ao final da fase entérica II (6 h), a viabilidade em ambos os produtos permaneceu estável, não diferindo da fase entérica I.

Figura 2 – Sobrevivência de *L. reuteri* LR 92 (log UFC/mL) em produtos à base de leite de coco fermentado (dia 1) durante exposição a condições *in vitro* de fase gástrica (2 h) e fase entérica I e II (4 e 6 h).



*Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas para a mesma formulação durante o ensaio *in vitro* ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre o mesmo tempo de amostragem do ensaio *in vitro* ($p < 0,05$); FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango.

Os sais biliares têm atividade antimicrobiana, estimulam dano ao DNA e desorganizam a estrutura da membrana celular de bactérias. Os probióticos do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são resistentes à bile devido aos mecanismos intrínsecos de resistência, como presença de sistema de efluxo de sais biliares ou prótons e modificação de bile por hidrolases de sais biliares (RUIZ; MARGOLLES; SÁNCHEZ, 2013). Sendo assim, pode-se observar que *L. reuteri* LR 92 apresentou estas características de linhagens probióticas devido à resistência apresentada na fase entérica dos ensaios.

Após incubação em condições gástricas e intestinais *in vitro*, a taxa de sobrevivência encontrada para FC foi $81,63 \pm 0,58$ % e para FCM, $74,17 \pm 1,65$ %. Os dois valores diferem estatisticamente, sendo a sobrevivência maior atribuída a FC.

Champagne e Gardner (2008) reportaram que em sucos de frutas, 4 linhagens de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* LB3, *L. rhamnosus* LB11, *L. reuteri* LB38 e *L. plantarum* LB42) apresentaram perda de viabilidade variando entre 2,6 a 2,8 log UFC/mL após simulação gástrica (pH 2). O *L. reuteri* LB38 apresentou perda de viabilidade 2,6 log UFC/mL após 2 h de fase gástrica, e 0,1 log UFC/mL após adição de bile (0,3%). Dessa maneira, *L. reuteri* foi mais resistente à bile.

Em contraste a este estudo, em suco *blend* de cenoura e mirtilo fermentado por *L. reuteri* LR 92, foi observado que a contagem de $10,27 \pm 0,21$ log UFC/mL reduziu até $4,23 \pm 0,03$ log UFC/mL após simulação gástrica, totalizando uma perda de viabilidade de aproximadamente 6 log UFC/mL. Quando submetido a condições intestinais de sais biliares, a perda de viabilidade foi 1,1 log UFC/mL (MAURO; GUERGOLETTTO; GARCIA, 2016).

No presente estudo foram observadas menores contagens iniciais de *L. reuteri*, contudo, a viabilidade apresentou melhor resultado após a simulação gastrointestinal, com redução de 1,47 log para FC ($6,51 \pm 0,05$ UFC/mL) e de 2,01 log UFC/mL para FCM ($5,84 \pm 0,13$ UFC/mL) após 6 horas de ensaio. Esses resultados fornecem evidências de que a composição da matriz alimentícia tem influência na sobrevivência de *L. reuteri*.

Os produtos FC e FCM contém lipídios provenientes do coco que podem interferir na viabilidade do microrganismo. Um iogurte integral com 3% (m/m) de gordura apresentou efeitos inibitórios *in vitro* contra bactérias probióticas quando comparado ao iogurte desnatado, especialmente para *Bifidobacterium bifidum* BBI (VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000). Por outro lado, o alto teor de gordura de queijos, baixo pH e textura densa podem oferecer proteção aos probióticos durante passagem pelo trato gastrointestinal (STANTON et al., 1998).

A presença da polpa de morango também pode ter influenciado na morte celular de *L. reuteri* no produto à base de leite de coco. Bedani et al. (2014) reportaram que a presença de polpas de fruta em iogurte de soja simbiótico diminuiu significativamente a sobrevivência dos probióticos após simulação gastrointestinal. Os autores encontraram taxa de sobrevivência de $37,6 \pm 5,4$ a $41,7 \pm 4,9$ % para

Lactobacillus acidophilus La-5 e taxa de $91,2 \pm 1,8$ a $97,3 \pm 2,2$ % para *Bifidobacterium animalis* Bb-12 após o ensaio.

O desenvolvimento de leites vegetais funcionais é novo e emergente no mercado mundial (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016). Por isso, mais testes devem ser conduzidos para investigar o comportamento de microrganismos incorporados a estas matrizes, bem como a influência da adição de polpa de frutas, essência, gomas e processo tecnológico de obtenção na viabilidade celular.

3.5 ANÁLISE SENSORIAL

Participaram da análise 105 julgadores de ambos os sexos, com idades de 15 a 25 anos (63,8%), 25 a 35 anos (31,4%), 35 a 50 (1,9%) e acima de 50 anos (2,9%). A maioria dos julgadores correspondeu a alunos da Universidade Estadual de Londrina (89,5%). O questionário preenchido pelos julgadores revelou que 98% afirmaram gostar/consumir produtos fermentados e 72,4% afirmaram gostar/consumir produtos contendo leite de coco.

O resultado do teste sensorial de aceitação está apresentado na Tabela 7. Todos os atributos receberam notas acima de 7, que corresponde a “gostei regularmente”. As médias de notas variaram de 7,04 a 8,23 para FC e de 7,25 a 8,18 para FCM.

Tabela 7 – Avaliação dos atributos sensoriais por escala hedônica e escala de atitude de produtos fermentados à base de leite de coco.

Atributo	Amostras	
	FC	FCM
Cor	$8,23 \pm 1,18^a$	$8,05 \pm 1,06^a$
Sabor	$7,57 \pm 1,49^a$	$7,87 \pm 1,29^a$
Textura	$7,04 \pm 1,70^a$	$7,25 \pm 1,69^a$
Aroma	$7,95 \pm 1,33^a$	$8,18 \pm 1,04^a$
Aceitação Global	$7,54 \pm 1,37^a$	$7,74 \pm 1,16^a$
Escala de atitude	$5,10 \pm 1,28^b$	$5,48 \pm 1,30^a$

Escala hedônica de aceitação: 1 = desgostei extremamente; 9 = gostei extremamente; Escala de atitude: 1 = nunca comeria; 7 = comeria sempre. Escores apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Letras minúsculas iguais não diferem entre linhas ($p < 0,05$). FC: fermentado à base de leite de coco; FCM: fermentado à base de leite de coco com adição de polpa de morango.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar diferenças significativas. Quando comparados, nenhum atributo diferiu estatisticamente entre FC e FCM, indicando que apesar de as amostras serem diferentes quanto à cor, sabor e aroma, os julgadores as aceitaram de forma semelhante. Os maiores valores hedônicos foram obtidos para cor (FC e FCM) e aroma de FCM.

No teste de escala de atitude, FCM foi preferida pelos provadores, obtendo média de 5,48 do total de 7 pontos da escala, enquanto FC obteve média 5,10. Este intervalo está entre “comeria frequentemente” e “comeria muito frequentemente”.

Embora uma porcentagem menor de julgadores (72,4%) afirmarem gostar/consumir produtos à base de leite de coco, a média dos escores para aceitação dos produtos foi satisfatória, se assemelhando a testes de escala hedônica (9 pontos) para soro de leite fermentado e iogurte com polpa de morango comerciais. Janiaski et al. (2016) reportaram que valores hedônicos de aceitação global obtidos para bebidas comerciais de soro fermentado variaram entre 4,9 e 7,5. Já os valores obtidos para iogurte com polpa de morango variaram entre 5,5 e 7,9.

Os consumidores brasileiros geralmente não têm o hábito de consumir leites vegetais fermentados devido à escassez destes no mercado, sendo a opção mais comum os derivados de soja. Portanto, os escores de aceitação global obtidos para os produtos à base de leite de coco mostram resultados satisfatórios e promissores no desenvolvimento destes novos produtos funcionais.

4 Conclusão

Os produtos à base de leite de coco fermentado FC e FCM desenvolvidos mostraram que *L. reuteri* foi capaz de manter a concentração celular viável recomendada (acima de 6 log UFC/mL) até o final de 30 dias de armazenamento a 4 °C. Após incubação em condições gástricas e intestinais simuladas, a taxa de sobrevivência encontrada para FC foi maior que para FCM. Na análise sensorial, os escores de aceitação global obtidos para os produtos à base de leite de coco foram satisfatórios, com médias acima de 7,5 de um total de 9 pontos de escala. No teste de escala de intenção, os consumidores atribuíram notas médias aos produtos situando-se entre “comeria frequentemente” e “comeria muito frequentemente”. Tais resultados sugerem que produtos fermentados à base de leite de coco com e sem adição de polpa de morango são bem aceitos sensorialmente e podem ser utilizados

como veículos para *L. reuteri*, a fim de desenvolver bebidas funcionais com grande potencial de mercado.

5 Referências

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 15^aed. Washington, 2006.

ÅRSKÖLD, E., LOHMEIER-VOGEL, E., CAO, R., ROOS, S., RÅDSTRÖM, P., VAN NIEL, E. W. J. Phosphoketolase Pathway Dominates in *Lactobacillus reuteri* ACC 55730 Containing Dual Pathways for Glycolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 190(1), p. 206-212, 2008.

BAÚ, T. R.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Optimization of a fermented soy product formulation with a kefir culture and fiber using a simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 8, p. 929–935, 2013.

BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 436–443, 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”. Órgão emissor: ANVISA -. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>, acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

BUVÉ, C.; KEBEDE, B. T.; DE BATSELIER, C.; CARRILLO, C.; PHAM, H. T. T.; HENDRICKX, M.; GRAUWET, T.; VAN LOEY, A. Kinetics of colour changes in pasteurised strawberry juice during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 216, p. 42–51, 2018.

CASAS J. A.; MOHEDANO A. F.; GARCIA-OCHOA F. J. Viscosity of guar gum and xanthan/guar gum mixture solutions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1722–1727, 2000.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 539–543, 2008.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; DE 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, n. 1–4, p. 261–266, 2013.

GAUCHE, C.; TOMAZI, T.; BARRETO, P. L. M.; OGLIARI, P. J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42(1), p. 239–243, 2009.

GRANATO, D., BRANCO, G. F., NAZZARO, F., CRUZ, A. G., FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292–302, 2010.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, H. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1640–1646, 2009.

HABIBI, H.; KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, n. December 2016, p. 130–140, 2017.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

IFT, 2015. **Dairy free beverages expand the milk aisle**. Disponível em: <<http://www.ift.org/newsroom/news-releases/2015/february/18/dairy-free-beverages-expand-the-milk-aisle.aspx>>, acesso em 11 de fevereiro de 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed (1ª ed digital). São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JANIASKI, D. R.; PIMENTEL, T. C.; CRUZ, A. G.; PRUDENCIO, S. H. Strawberry-flavored yogurts and whey beverages: What is the sensory profile of the ideal product? **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5273–5283, 2016.

JASTER, H.; AREND, G. D.; REZZADORI, K.; CHAVES, V. C.; REGINATTO, F. H.; PETRUS, J. C. C. Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration. **Food Research International**, v. 104, p. 119–125, 2018.

JESKE, S.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. **Food Research International**, 2017.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPOULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M. Health Benefits of Probiotics: A Review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

LANGA, S., LANDETE, J. M., MARTÍN-CABREJAS, I., RODRÍGUEZ, E., ARQUÉS, J. L., MEDINA M. *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products, **Food Control** v. 33 p. 1-5, 2013.

MÄKINEN, O. E.; UNIACKE-LOWE T.; O'MAHONY J. A.; ARENDT, E. K. Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-

based milk substitutes and lactose free bovine milk. **Food Chemistry**, v. 168, p. 630–638, 2015.

MAURO, C.; GUERGOLETTTO, K.; GARCIA, S. Development of Blueberry and Carrot Juice Blend Fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 37, 2016.

MCCARTHY, K. S.; PARKER, M.; AMEERALLY, A.; DRAKE, S. L.; DRAKE, M. A. Drivers of choice for fluid milk versus plant-based alternatives: What are consumer perceptions of fluid milk? **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6125–6138, 2017.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: Processing, properties and food applications - A Review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 409–418, 2014.

NIELSEN. Plant Based Foods Sales Experience 8.1 Percent Growth Over Past Year, disponível em: <<http://www.prweb.com/releases/2017/09/prweb14683840.htm>>, acesso em 8 de fevereiro de 2018.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111–117, 2011.

OCHOA-VELASCO, C. E.; CRUZ-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO-BELTRÁN, J. Á. Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in coconut (*Cocos nucifera* L.) milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 199–204, 2014.

OLIVEIRA, A.; ALEXANDRE, E. M. C.; COELHO, M.; LOPES, C.; ALMEIDA, D. P. F.; PINTADO, M. Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. **Food Chemistry**, v. 171, p. 370–378, 2015.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações do café. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 689–694, 2011.

PAQUIN, P. Functional and Speciality Beverage Technology - 1st Edition, Woodhead Publishing, 2009.

PEREIRA, A. L. F.; ALMEIDA, F. D. L.; DE JESUS, A. L. T.; DA COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155–3165, 2013

Resolução RDC nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o “Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos”. **Órgão emissor: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**

RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. DEC, p. 1–8, 2013.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 133–139, 2005.

SEOW, C. C.; GWEE, C. N. Review Coconut milk: chemistry and technology. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 189–201, 1997.

SETHI, S.; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3408–3423, 2016.

SHORI, A. B. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 423–431, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317 p

SIRIPHANICH, J.; SARADHULDHAT, P.; ROMPHOPHAK, T.; KRISANAPOOK, K.; PATHAVEERAT, S.; TONGCHITPAKDEE, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.), **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**, Vol 3: Cocona to Mango. Woodhead Publishing in Food Science Technology and Nutrition, p. 8–33, 2011.

SREERAMULU, D.; RAGHUNATH, M. Antioxidant and Phenolic Content of Nuts, Oil Seeds, Milk and Milk Products Commonly Consumed in India. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, n. 5, p. 422–427, 2011.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5–6, p. 491–496, 1998.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.19, p. 63-68, 1959.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 97–102, 2000.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 7, p. 579–589, 2002.

WANG, Q.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B. The stability of guar gum in an aqueous system under acidic conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 129-134, 2000.

WANG, Z.; ZHANG, M.; WU, Q. Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1174–1178, 2015.

Conclusão geral

O presente trabalho mostrou que os microrganismos *L. reuteri* LR 92 e *L. reuteri* DSM 17938 apresentaram crescimento em leite de coco, sem a necessidade de suplementação. A otimização das melhores condições de crescimento foi essencial para estudar o efeito das variáveis temperatura e concentração de polpa de coco no crescimento de *L. reuteri*. O perfil de açúcares e ácidos orgânicos obtidos durante a processo fermentativo evidenciou que, embora fossem da mesma espécie, as linhagens se comportaram de maneira distinta na matriz fermentativa.

A linhagem DSM 17938 apresentou multiplicação celular em armazenamento à baixa temperatura, acentuada diminuição de pH e pós acidificação após 30 dias. A linhagem LR 92 apresentou baixa pós acidificação e menor variação de pH, por isso, foi escolhida para elaboração de dois produtos: um à base de leite de coco fermentado (FC) e à base de leite de coco fermentado com adição de polpa de morango (FCM). No desenvolvimento dos produtos, o estudo da proporção de goma guar e goma xantana para promover maior viscosidade e ausência de sinérese foi importante para assegurar a estabilidade da emulsão.

As análises durante 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C mostraram diferenças no comportamento dos produtos FC e FCM. Foram detectados maior teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante para FCM comparado a FC. A viabilidade de *L. reuteri* LR 92 apresentou diminuição nos dois produtos após 30 dias de armazenamento, porém esta foi maior para FCM. Da mesma maneira, após simulação de passagem pelo trato gastrointestinal, a taxa de sobrevivência de FCM foi menor comparada a FC.

Os resultados obtidos na análise sensorial foram satisfatórios, mostrando que os produtos foram bem aceitos, com nota global acima de 7,5 de um total de 9 pontos de escala de aceitação hedônica. O teste de escala de atitude apresentou notas acima de 5,1 do total de 7 pontos.

O desenvolvimento de produtos contendo leites vegetais é novo e emergente no mercado mundial. Pode-se concluir que os produtos desenvolvidos fornecem alternativas funcionais e sensorialmente agradáveis aos consumidores que são intolerantes ou que não apreciam matrizes lácteas.

APÊNDICE

Apêndice A

Amostras FC e FCM servidas na análise sensorial de escala hedônica de aceitação e escala de atitude ou intenção.




ANEXOS

Anexo A

Bula do medicamento Provance (Aché – Biogaia)

achē
ProVance

Lactobacillus reuteri DSM 17938
em comprimidos mastigáveis



BioGaia.

RESERVED AREA FOR BARCODE

Folheto Informativo

Você acaba de adquirir PROVANCE[®], um produto a base de probióticos, feito sob medida para a saúde intestinal. Associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis, PROVANCE[®] pode auxiliar no funcionamento do intestino.

A ingestão de 1 comprimido mastigável ao dia, fornece 1x10⁸ UFC (100.000.000 de Unidades Formadoras de Colônias) de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, auxiliando no controle das bactérias presentes no intestino, ao inibir o crescimento das bactérias nocivas ao organismo. PROVANCE[®] possui um agradável sabor limão!

Saiba mais sobre a saúde de seu intestino e desfrute de uma vida saudável!

O que são probióticos?

A Organização Mundial de Saúde define **PROBIÓTICOS** como "organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro". Para garantir o equilíbrio da flora intestinal, os probióticos controlam o crescimento e a proliferação das bactérias patogênicas, produzindo substâncias capazes de matar esses micro-organismos e de estimular o sistema imunológico local, além de aderir à mucosa ou revestimento interno do intestino, competindo com os micro-organismos nocivos e inibindo sua fixação local.

No entanto, para que o probiótico possa exercer sua função na forma e no local adequados, é necessário que, após sua ingestão, esses micro-orga-

RESERVED AREA FOR BARCODE

RESERVED AREA FOR BARCODE

RESERVED AREA FOR BARCODE

nismos alcancem o cólon (porção final do intestino) ainda vivos e em quantidades suficientes. Para isso, os probióticos precisam ser resistentes à acidez do estômago, às enzimas e aos sais biliares intestinais, precisam também aderir à mucosa intestinal, inibir a proliferação de bactérias patogênicas e ser resistentes a determinados antibióticos. Todas essas características necessitam estar presentes no tipo de probiótico presente no produto, para que se garanta sua eficácia e segurança de uso.

Os probióticos de PROVANCE[®]


PROVANCE[®] possui em sua composição o *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, o qual é um dos poucos probióticos que reside no trato gastrointestinal de humanos, foi extensivamente estudado com relação à saúde gastrointestinal e passou por testes laboratoriais e estudos clínicos que garantem que esses probióticos cheguem viáveis ao intestino, ou seja, vivos e em quantidade suficiente para exercerem seu efeito. Testes laboratoriais demonstraram que os probióticos de PROVANCE[®] são resistentes à acidez do estômago, às enzimas e aos sais biliares intestinais, aderem adequadamente a células da mucosa intestinal, inibem a proliferação de bactérias patogênicas e são resistentes a determinados antibióticos. Essas características permitem que os probióticos de PROVANCE[®] cheguem ao intestino e atuem de forma eficiente e segura.

Como usar PROVANCE[®]

Recomenda-se a ingestão de 1 comprimido mastigável ao dia de PROVANCE[®], não devendo exceder este limite. A ingestão de 1 comprimido mastigável de PROVANCE[®] fornece 10⁸ UFC (100.000.000 de Unidades Formadoras de Colônias) de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 vivos. Estudos demonstram que a utilização de PROVANCE[®] é segura para população de adultos, idosos e pediátrica.

O uso dos probióticos presente em PROVANCE[®] pode auxiliar no funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

RESERVED AREA FOR BARCODE



0800 701 6900
cac@ache.com.br
www.ache.com.br

RESERVED AREA FOR BARCODE

5296-002 BU150048100 FOLH 01 05/17

Anexo B

Boletim de análise da goma xantana (fabricante Xinjiang Fufeng Biotechnologies Co. Ltd, China)

BOLETIM DE ANÁLISE

Produto: Goma Xantana 200 mesh
Fabricante: Xinjiang Fufeng Biotechnologies Co., Ltd.
PO 5307/16

Data de Fabricação: 15/09/2016
Data de Validade: 14/09/2018
Lote: X201609B-N02

Características	Especificações	Resultados
Aparência	Pó amarelo claro ou como branco	Conforme
Tamanho de partícula (mesh)	100% através de 80 mesh, não menos que 92% através de 200 mesh	Conforme
Viscosidade (1% KCL, cps)	1200 – 1700	1650
Taxa de cisalhamento	≥6.5	7.8
V1/V2	1.02 ~ 1.45	Conforme
PH (1% solução)	6.0 – 8.0	6.82
Perda por secagem (%)	≤15	8.29
Cinzas (%)	≤16	9.5
Pb (ppm)	≤2	Conforme
Total de Nitrogênio (%)	≤1.5	Conforme
Ácido Pirúvico (%)	≥1.5	Conforme
Contagem de placa total (CFU/g)	≤2000	100
Fungos/leveduras (CFU/g)	≤100	100
Coliformes (MPN/g)	≤0.3	Conforme
Salmonela	Ausente	Conforme

Boletim elaborado de acordo com dados fornecidos pelo fabricante

CERTIFICADO EMITIDO ELETRONICAMENTE, DISPENSA ASSINATURA.

Carine Nührich
Engenheira Química
CRQ 13.301.676

Anexo C

Boletim de análise da goma guar (fabricante Durga Enterprises, India)

Boletim de Analise - 1.001.043.557 /01

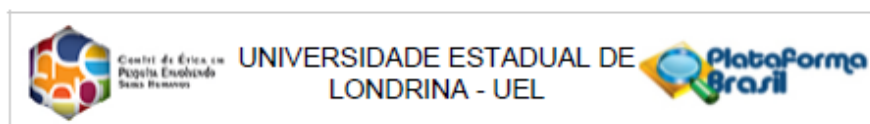
Produto GOMA GUAR

Data de Fabricação: 12/11/16
Data de Validade: 11/11/18
Lote: VB-1848

Característica	Especificação	Resultados
Viscosidade	5000~6000 cps	5350 cps
Aparencia	PO BRANCO A CREME	PO BRANCO A CREME
pH	5,50~6,50 %	5,85 %
Umidade	<12,00 %	9,80 %
Cinzas	<1,00 %	0,68 %
Proteína	<5,00 %	3,10 %
Contagem total	<6000 gm	6000 gm
Bolor e levedura	<2000 gm	50 gm
Salmonela	AUSENTE	AUSENTE
Coliformes	AUSENTE	AUSENTE
E. Coli	AUSENTE	AUSENTE
Staph. Aureus	AUSENTE	AUSENTE
Granulometria retido na malha 200 mesh	>90,00 %	98,40 %
Goma	>80,00 %	84,37 %

Anexo D

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Londrina.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de produto probiótico à base de leite de coco com adição de polpa de fruta

Pesquisador: Sandra Garcia

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 67962217.4.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

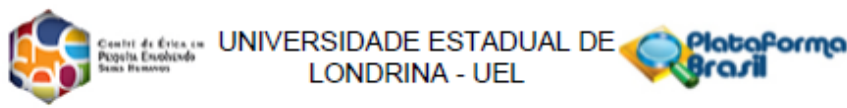
Número do Parecer: 2.077.222

Apresentação do Projeto:

Desenvolvimento de produto probiótico à base de leite de coco com adição de polpa de fruta - Será desenvolvido e caracterizado um produto fermentado por *Lactobacillus reuteri* (cepas LR02 e DSM 17938) à base de leite de coco para uso como um novo produto probiótico, avaliando a estabilidade durante o armazenamento e realizando análise sensorial de aceitação do produto.

O microrganismo probiótico *Lactobacillus reuteri* é capaz de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e produzir efeitos benéficos à saúde do indivíduo, quando consumido em doses adequadas, diariamente. Os produtos fermentados disponíveis no mercado são muitas vezes restritos às matrizes lácteas e, portanto, a avaliação de leites vegetais como veículos para fermentação é uma alternativa a este fato. O leite de coco consiste em um líquido extraído mecanicamente a partir do endosperma do coco (*Cocos nucifera*) maduro. Este possui pH (8,0) ligeiramente ácido como o do leite e pode ser um meio de cultura favorável ao crescimento de probióticos. Além disso, o uso do leite de coco tem sido difundido no Brasil devido à disponibilidade de obtenção e por ser rico em nutrientes como minerais, vitaminas, proteínas e lipídeos. As gomas guar e xantana são aditivos comuns adicionados ao leite de coco, exercendo a função de estabilizantes de emulsões óleo em água. Sendo assim, o desenvolvimento de um produto probiótico de origem não láctea é ideal para consumidores com restrição quanto ao

Endereço: LABECC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.077.222

consumo de lactose ou que não apreciam alimentos lácteos. Pretende-se testar o crescimento de microrganismos probióticos em matriz não láctea (leite de coco), verificar a sobrevivência dos probióticos e a aceitação do produto vegano por julgadores não treinados.

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho tem como objetivos otimizar a fermentação de leite de coco por bactéria probiótica (*Lactobacillus reuteri*) com adição de polpa de fruta (morango), avaliar a composição centesimal, composição de minerais, capacidade antioxidante, contagem de bactérias lácticas, sobrevivência dos microrganismos durante armazenamento e durante simulação gástrica, pH, cor, acidez titulável, viscosidade, capacidade de

retenção de água, sólidos solúveis totais, quantificar a produção do antimicrobiano reuterina, bem como analisar sensorialmente os produtos fermentados quanto à aceitação e intenção de compra.

Desenvolver e caracterizar um produto fermentado por *Lactobacillus reuteri* (cepas LR02 e DSM 17938) à base de leite de coco para uso como um novo produto probiótico, avaliar a estabilidade durante o armazenamento e aplicar a avaliação sensorial de aceitação do produto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Serão convidados a participar da análise sensorial 100 indivíduos de ambos os sexos, que corresponderão a alunos, servidores e professores da universidade.

A ingestão do produto formulado não traz riscos à saúde, entretanto, raramente, podem ocorrer desconfortos abdominais como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, que deverão cessar algumas horas após a interrupção do consumo do produto.

Como benefícios pode-se afirmar que os microrganismos probióticos atuam na promoção e manutenção de saúde dos consumidores devido aos efeitos benéficos que eles

proporcionam no organismo. Os efeitos são atribuídos a mecanismos de ação comuns a esta classe, como a modificação do pH por produção de ácidos, resistência à colonização de patógenos, regulação do trânsito intestinal, normalização da microbiota desbalanceada e exclusão competitiva de patógenos. O probiótico *Lactobacillus reuteri* tem demonstrado segurança e eficácia no tratamento de cólicas infantis, diarreias infecciosas agudas, normalização da microbiota humana, combate de microrganismos patogênicos, atenuação de gengivite em idosos e até redução do colesterol total em indivíduos com hipercolesterolemia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa pretende Desenvolver um produto funcional probiótico para indivíduos com restrição

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.077.222

ou que não apreciam produtos lácteos (veganos). Serão entrevistados 100 pessoas de ambos os sexos (alunos, servidores, professores da universidade).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma de execução e orçamento financeiro devidamente detalhados.

Folha de rosto assinada pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em ciência de alimentos.

TCLE - claro e adequado.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_014079.pdf	04/05/2017 10:34:59		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostoassinada.pdf	04/05/2017 10:34:08	Sandra Garcia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCarolinaSIMauro.pdf	04/05/2017 10:17:13	Sandra Garcia	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	04/05/2017 10:16:51	Sandra Garcia	Aceito

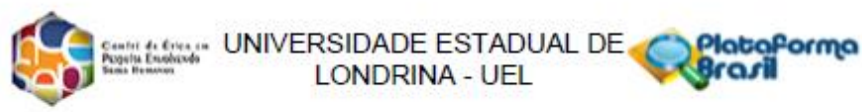
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.077.222

LONDRINA, 23 de Maio de 2017

Assinado por:
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
UF: PR Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br

Anexo E

Termo de consentimento livre e esclarecido para os provadores do produto
probiótico à base de leite de coco

“DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO PROBIÓTICO À BASE DE LEITE DE COCO COM ADIÇÃO DE POLPA DE FRUTA”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO PROBIÓTICO À BASE DE LEITE DE COCO COM ADIÇÃO DE POLPA DE FRUTA”, realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, Londrina/PR. O objetivo da pesquisa é desenvolver um produto fermentado a base de leite de coco utilizando a cultura probiótica *Lactobacillus reuteri*. A sua participação é muito importante, e irá requerer cerca de 15 minutos. Você participará como provador e irá consumir produtos fermentados de leite de coco formulado, sendo solicitado a dar sua opinião sobre as características do produto (cor, aroma, sabor, etc), informando o quanto você gostou de cada atributo. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. A ingestão do produto formulado não traz riscos à saúde, entretanto, raramente, podem ocorrer desconfortos abdominais como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, que deverão cessar algumas horas após a interrupção do consumo do produto. Informamos que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado por sua participação. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar (Prof^a Dr^a Sandra Garcia, DCTA/UEL, sgarcia@uel.br), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina CEP/UEL, localizado na Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380 (PR 445) Campus Universitário- ao lado do Banco Itaú Londrina- PR- CEP: 86057-970, ou no telefone (43) 3371-5455. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada e entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 201_.

Pesquisador Responsável

Sandra Garcia

Carolina Saori Ishii Mauro

Aluna de mestrado em Ciência de Alimentos

Eu, _____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura : _____

Data: ___/___/___

Anexo F

Questionário sobre coleta de dados do provador

Coleta de dados do Provador

Desejamos avaliar sensorialmente a aceitação de leites de coco fermentados com adição bactéria láctica (*Lactobacillus reuteri*). Ser um julgador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA, leva em torno de 10 minutos. Se você deseja participar do teste, por favor, preencha este formulário.

Dados Pessoais:

Nome: _____

1. Faixa etária:

- 15-25
- 25-35
- 35-50
- acima de 50 anos

3. Ocupação:

- Aluno
- Funcionário
- Professor
- Outro

5. Gosta/consome bebida fermentada? () Sim () Não

6. Gosta/consome leite de coco? () Sim () Não

7. Frequência de consumo de produtos contendo leite de coco:

- Nunca
- Ocasionalmente - _____ vezes por ano
- Moderadamente - _____ vezes por mês
- Frequentemente - _____ vezes por semana

8. Frequência de consumo de produtos fermentados contendo probióticos:

- Nunca
- Ocasionalmente - _____ vezes por ano
- Moderadamente - _____ vezes por mês
- Frequentemente - _____ vezes por semana

9. Produtos que costuma consumir (7, 8).

Anexo G

Ficha utilizada para avaliar a aceitação sensorial do leite de coco fermentado

TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____

Você está recebendo uma amostra de leite de coco fermentado com a cultura probiótica *Lactobacillus reuteri* com ou sem adição de polpa de morango. Por favor, avalie a amostra com relação aos atributos cor, sabor, textura, aroma e aceitação global, segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo:

- (9) gostei extremamente
- (8) gostei moderadamente
- (7) goste regularmente
- (6) gostei ligeiramente
- (5) não gostei, nem desgostei.
- (4) desgostei ligeiramente
- (3) desgostei regularmente
- (2) desgostei moderadamente
- (1) desgostei extremamente

AMOSTRA	COR	SABOR	TEXTURA	AROMA	ACEITAÇÃO GLOBAL

Comentários: _____

Anexo H

Ficha utilizada para avaliar a aceitação por escala de atitude do leite de coco fermentado

TESTE DE ESCALA DE ATITUDE

Nome: _____

Você está recebendo uma amostra de leite de coco fermentado com a cultura probiótica *Lactobacillus reuteri* com ou sem adição de polpa de morango. Por favor, avalie a amostra globalmente segundo o grau de aceitação dos produtos, utilizando a escala abaixo:

- (7) comeria sempre
- (6) comeria muito frequentemente
- (5) comeria frequentemente
- (4) comeria ocasionalmente
- (3) comeria raramente
- (2) comeria muito raramente
- (1) nunca comeria

AMOSTRA	ACEITAÇÃO

Comentários: _____
