

## Água de coco com potencial probiótico

### Coconut water with probiotic potential

Claudia Dorta <sup>1\*</sup>, Maria Beatriz Silva <sup>1</sup>, Thamires Maria Simões da Silva <sup>1</sup>, Elke Shigematsu <sup>1</sup>,  
Flavia Maria Vasques Farinazzi Machado <sup>1</sup>, Juliana Audi Giannoni <sup>1</sup>, Renata Bonini Pardo <sup>1</sup>,  
Alice Yoshiko Tanaka <sup>1</sup>

---

#### RESUMO

Este estudo teve por objetivo obter uma bebida com potencial probiótico, adicionando *Lactobacillus acidophilus* ( $10^9$  UFC/mL) em água de coco comercial refrigerada. Foram feitas análises de pH, acidez total, e análises microbiológicas (viabilidade celular de *L. acidophilus*, mesófilos aeróbios e fungos) até 25 dias de armazenamento a 4°C. Testes de resistência aos sais biliares (0,3 e 0,6%) e ao ácido clorídrico (pH 2,0, 2,5 e 3,0 por 2h) foram feitos em *L. acidophilus* adicionado à bebida em 15 e 25 dias de armazenamento. Utilizou-se análise de variância (ANOVA), teste Tukey e Teste-t (significativos para  $p < 0,05$ ). *L. acidophilus* teve viabilidade celular desejável em todas as amostras testadas, durante os 25 dias de armazenamento a 4°C; e após tratamentos com sais biliares e o ácido clorídrico durante o armazenamento. A água de coco comercial refrigerada usada não apresentou boa qualidade higiênica, pois foram encontrados mesófilos aeróbios e leveduras acima de limites recomendados. *L. acidophilus* exerceu efeito inibitório sobre leveduras naturais e adicionadas na água de coco comercial. Esta bebida apresentou potencial probiótico e mostrou capacidade de estender a vida de prateleira do produto.

**Palavras-chave:** Alimentos Funcionais; *L. Acidophilus*; Viabilidade; Sais Biliares

---

#### ABSTRACT

This study aimed to obtain a drink with probiotic potential through the addition of *Lactobacillus acidophilus* ( $10^9$  CFU/mL) to a refrigerated commercial coconut water. This drink was submitted to pH, total acidity and microbiological (*L. acidophilus* cell viability, aerobic mesophilic bacteria and fungi) analyses during 25 days under 4°C storage. Likewise, resistance tests to bile salts (0.3 and 0.6%) and to hydrochloric acid (pH 2.0, 2.5 and 3.0 for 2h) were performed on *L. acidophilus* added to the drink, at 15th and 25th days of storage. Samplings were submitted to statistical variance analysis (ANOVA), Tukey test and t-Test (considered significant  $p < 0.05$ ). *L. acidophilus* presented desirable cell viability in all tested samples, both during the 25 days interval under 4°C and after the treatments with bile salts and hydrochloric acid during the entire storage interval. The refrigerated commercial coconut water used did not show good hygienic quality as aerobic mesophilic bacteria and yeasts were counted above recommended limits. Furthermore, *L. acidophilus* exerted an inhibitory effect on naturally and on the added yeasts. This drink presented a probiotic potential and the ability to extend the shelf life of the product.

**Keywords:** Functional food; *L. acidophilus*; Viability; Bile salts

---

---

<sup>1</sup> Faculdade de Tecnologia de Marília  
\*E-mail: dortafatec@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A preocupação com um estilo de vida adequado e o consumo de alimentos saudáveis, visando a maior expectativa de vida tem aumentado a procura dos consumidores por produtos com substâncias biologicamente ativas, produtoras de efeitos fisiológicos e metabólicos benéficos que podem promover a saúde e aumentar a longevidade (SILVA; ORLANDELLI, 2019).

Neste conceito, os probióticos são micro-organismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem tais efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001, SAAD, CRUZ, FARIA, 2011). Os probióticos mais estudados são bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ZIELIŃSKA; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, 2018). Dentre seus benefícios estão a diminuição da constipação intestinal, a redução de infecções e intoxicações alimentares microbianas, o aumento do sistema imunológico, a inibição do crescimento e da divisão de células cancerosas *in vitro*, a diminuição de substâncias putrefativas no intestino, além da redução de colesterol e amônia sanguíneos (LOURENÇO, GONZALEZ, 2022; SANTOS et al., 2020).

No entanto, técnicas de processamento dos alimentos que contenham bactérias probióticas podem levar a injúria destes micro-organismos e conseqüentemente diminuir sua capacidade de sobrevivência no intestino, reduzindo seus efeitos benéficos no organismo humano. É preciso levar em conta que as etapas dos processos tecnológicos para obtenção de um alimento probiótico, como pH baixo (abaixo de 4,5), aeração, refrigeração, congelamento podem interferir na viabilidade do micro-organismo (ALGAITHI et al., 2022; KIEPŚ; DEMBICZYŃSKI, 2022).

Existem atualmente, veículos utilizados para carrear bactérias probióticas, que permitam sua chegada ao intestino sem que sejam injuriadas, os quais integram três grandes grupos: alimentos infantis, preparações farmacêuticas e produtos lácteos. Destes, o grupo mais representativo é o dos produtos lácteos, principalmente leites fermentados, iogurtes, sorvetes e queijos, nos quais utilizam-se frequentemente culturas iniciadoras, como as de *Lactobacillus acidophilus* (GOCER et al., 2021; GOMES; MALCATA, 1999). No entanto, o leite está entre os alimentos mais comumente envolvidos em casos de alergias e intolerâncias, sendo responsável por cerca de 2 a 3% das alergias que

acometem a população infantil com menos de 3 anos (GONÇALVES et al, 2016; NWARU et al., 2014).

A introdução destes micro-organismos em produtos não lácteos permitiria o seu consumo por pessoas intolerantes à lactose, alérgicas às proteínas do leite e hipercolesterolêmicas, que se recusam a ingerir produtos lácteos por razões particulares ou quando estes produtos são inacessíveis (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004). Desta forma, o objetivo deste estudo foi adicionar probióticos *L. acidophilus* em água-de-coco comercial refrigerada com intenção de se obter uma bebida com potencial probiótico, que possa ser consumida por pessoas alérgicas e/ou intolerantes ao leite e derivados.

## MATERIAL E MÉTODOS

A água-de-coco foi obtida de uma marca comercial envasada e refrigerada, produzida no município de Marília-SP. O *Lactobacillus acidophilus* liofilizado comercial foi obtido de uma Farmácia distribuidora da cidade de Marília-SP, que importa o produto, sendo mantido sob refrigeração no Laboratório de Microbiologia da Fatec Marília-SP. Para avaliar a capacidade de inibição por *L. acidophilus* sobre leveduras contaminantes da água-de-coco, foi utilizada *Saccharomyces cerevisiae*, obtida em um supermercado da cidade de Marília, de marca comercial para panificação.

### Preparo das amostras

A bactéria *L. acidophilus* foi adicionada na ordem de  $10^9$  UFC/mL em 290 mL de água-de-coco comercial (AMC) em Erlenmeyers de 500 mL. Em outra amostra de 290 mL de água-de-coco comercial (AML) foram adicionados *L. acidophilus* na ordem de  $10^9$  UFC/mL e *Saccharomyces cerevisiae* a  $10^5$  UFC/mL para o teste de inibição/competição (Tabela 1).

**Tabela 1:** Variáveis amostrais a partir da água-de-coco refrigerada

	Água-de-coco refrigerada	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ( $10^9$ UFC/mL)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ( $10^5$ UFC/mL)
AMC*	X	X	
AML	X	X	X
MAS	X		

\*AMC = água-de-coco com adição de *L. acidophilus*, AMS = água-de-coco sem adição de *L. acidophilus*, AML = água-de-coco com adição de *L. acidophilus* e *S. cerevisiae*.

Como controle (AMS) foi usada a água-de-coco comercial sem a adição da bactéria probiótica ou levedura. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, em condições assépticas e mantidos refrigerados a 4° C durante 25 dias. A água-de-coco refrigerada comercial usada nos experimentos possui apenas 20 dias de vida útil, conforme fabricante.

### **Análises de pH e acidez total**

Foram realizadas análises de pH e acidez total das amostras AMC, AML e AMS nos tempos 0 e após 7, 15 e 25 dias de armazenamento destas sob refrigeração a 4° C. O pH foi determinado através de leitura direta com o uso do pHmetro, devidamente calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0 (AOAC, 1995).

A determinação da acidez total foi obtida através da titulação de NaOH 0,1 mol/L nas amostras adicionadas de fenolftaleína 1% (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

### **Análises Microbiológicas**

#### **Análises de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras**

Foram quantificados mesófilos aeróbios pelo plaqueamento em superfície no meio PCA (Difco™) a 35° C por 24h, e bolores e leveduras através do meio PDA incubado a 28° C por até 5 dias (SILVA et al., 2007).

#### **Contagem de *Lactobacillus acidophilus***

Para as análises de viabilidade celular de *L. acidophilus*, as amostras (AMC e AML) foram diluídas a 10<sup>-1</sup> em leite Molico contendo 0,3% (p:v) de extrato de levedura, mantidas a 32° C por 40 minutos antes de seguir as diluições seriadas de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup> em extrato de levedura 0,1% (p:v). A semeadura foi feita em profundidade no meio PCA (Difco™) adicionado de cetoconazol (antifúngico) a 120 ppm e incubação a 35° C por 48 horas. Em testes laboratoriais preliminares a este trabalho verificou-se que PCA poderia substituir o MRS na contagem de *Lactobacillus*, não havendo diferença significativa do número de colônias entre estes dois meios.

#### **Teste de resistência do probiótico aos sais biliares e ao ácido clorídrico**

A bactéria probiótica quando é adicionada a um alimento deve manter certo número de células viáveis que resistam ao sistema digestivo. Sendo assim, deve-se proceder o teste de resistência do probiótico ao ácido clorídrico e aos sais biliares (BRASIL, 2008). Para tal, foram feitas as contagens de células viáveis de *L. acidophilus*

nas amostras de água-de-coco AMC e AML, após 15 e 25 dias de armazenamento, através de PCA (controle) e PCA adicionado com 0,3% e 0,6% de extrato de bile da Oxoid. Seguiu-se a diluição seriada das amostras em tubos de 9 mL com extrato de levedura 0,1% (p:v), de acordo com a metodologia de Andrighetto e Gomes (2003), com modificações. Foi feita a sementeira em profundidade das amostras diluídas nos meios PCA com e sem sais biliares e incubados a 35° C por 48h.

Para tolerância ao ácido, colocou-se 1 mL das amostras (AMC e AML), nos tempos 15 e 25 dias, em tubos de ensaio com 9 mL de solução tampão fosfato salino (0,8% de NaCl, 0,2% de KCl, 0,14% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,024% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) acidificada por HCl 5N (THIRABUNYANON; BOONPRASON; NIAMSUP, 2009, com modificações). Os testes foram realizados em pH 2,0, 2,5, 3,0 e 7,4 (controle) por 2h em incubadora a 37°C. Após esse período, fez-se a diluição seriada das amostras tratadas e não tratadas (controle) em solução tampão fosfato (pH 7,4); as diluições foram semeadas em profundidade em meio PCA e incubadas a 35° C e após 48 h foram feitas as contagens das unidades formadoras de colônias.

### **Análise estatística**

As amostragens foram feitas em triplicata e seus dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University Camden, New Jersey). O Teste-t foi aplicado através do mesmo programa quando houve necessidade de comparar médias entre dois grupos amostrais. Os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análise de pH e acidez total das amostras**

As Tabelas 2 e 3 mostram os valores de pH e da acidez das amostras estudadas durante o período de 25 dias de armazenamento refrigerado a 4°C.

O pH das amostras apresentou valores médios dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) que permite um valor mínimo de pH de 4,30 para água-de-coco, não estabelecendo um valor máximo.

Tabela 2. Valores de pH das amostras analisadas durante o armazenamento a 4°C

<b>Amostras**</b>	<b>T0*</b>	<b>T7</b>	<b>T15</b>	<b>T25</b>
<b>AMC</b>	4,83 <sup>a***</sup> ± 0,02	4,82 <sup>a</sup> ± 0,01	4,76 <sup>a</sup> ± 0,05	4,76 <sup>a</sup> ± 0,01
<b>MAS</b>	4,90 <sup>a</sup> ± 0,01	4,88 <sup>ab</sup> ± 0,01	4,85 <sup>bc</sup> ± 0,01	4,82 <sup>c</sup> ± 0,01

<b>AML</b>	4,77 <sup>a</sup> ± 0,01	4,74 <sup>b</sup> ± 0,01	4,70 <sup>c</sup> ± 0,01	4,67 <sup>d</sup> ± 0,01
------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

\* T0 = 1<sup>a</sup> hora de armazenamento, T7, T15 e T25 = 7, 15 e 25 dias de armazenamento.

\*\* AMC = água-de-coco com adição de *L. acidophilus*, AMS = água-de-coco sem adição de *L. acidophilus*, AML= água-de-coco com adição de *L. acidophilus* e *S. cerevisiae*. \*\*\* Amostras dispostas em linha e seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

As amostras apresentaram variações pequenas de pH durante o período de 25 dias de armazenamento, embora tenham sido significativas apenas para as amostras AMS e AML. Estas oscilações de pH segundo a literatura podem ser consideradas pouco relevantes, pois de acordo com Oliveira et al., (2002) ao longo do tempo de estocagem de leites fermentados, abaixo de 0,12 são decréscimos menores e variações entre 0,14 e 0,32, decréscimos perceptíveis. Em estudo de Ulate (2017) também não houve alteração significativa nos valores de pH de amostras de uma bebida a base de água de coco micro filtrada adicionada de *L. paracasei* armazenadas por um período de 28 dias.

Pequenas variações de pH podem indicar que os micro-organismos presentes realizaram atividades metabólicas, entretanto de maneira lenta devido à baixa temperatura, a qual diminui as atividades enzimáticas, ou mesmo em função do predomínio de mesófilos (BLACK, 2002).

Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) mostraram que em leites fermentados e armazenados a 4° C durante 21 dias, cepas de *B. longum* diminuíram o pH em 0,04 - 0,05 e cepas de *L. acidophilus* em 0,05. Segundo os autores os valores de pH obtidos por tais bactérias indicam a reduzida capacidade de acidificação destes micro-organismos na estocagem refrigerada. Entretanto, Silva (2012) verificou que *L. acidophilus* em água-de-coco comercial refrigerada a 4° C causou reduções perceptíveis no pH de 0,4 e 0,87 em 15 e 20 dias, respectivamente. Segundo o autor tal resultado poderia indicar que o micro-organismo adicionado, mesmo em baixa temperatura, mostrou metabolismo de manutenção ou mesmo os fungos contaminantes encontrados no produto podem ter contribuído de forma sinérgica para esta diminuição.

Prado (2007) ao formular uma bebida fermentada a base de água-de-coco com uma linhagem de *Lactobacillus* isolada de água-de-coco verde verificou maior queda no pH comparativamente a este estudo. A referida autora mostrou que o pH da bebida fermentada caiu consideravelmente de 4,6 para 3,8 (ou seja, uma variação de 0,8), nos primeiros 14 dias de estocagem a 5° C e se manteve constante, em torno de 3,7, até o final do experimento.

As amostras deste estudo apresentaram aumento significativo da acidez total durante os 25 dias de armazenamento (Tabela 3). Na amostra adicionada de probiótico e levedura (AML) houve maior produção de ácidos atingindo no 25º dia de armazenamento uma diferença de 1,07 na acidez em relação ao tempo inicial, sendo ainda observadas variações menores para as demais amostras, mas ainda assim estatisticamente significativas.

**Tabela 3.** Variação da acidez total (g/100mL) das amostras analisadas durante o armazenamento a 4° C.

Amostras **	T0*	T7	T15	T25
AMC	1,00 <sup>a***</sup> ± 0,00	1,10 <sup>b</sup> ± 0,00	1,20 <sup>c</sup> ± 0,00	1,60 <sup>d</sup> ± 0,10
AMS	0,95 <sup>a</sup> ± 0,00	1,20 <sup>b</sup> ± 0,00	1,37 <sup>c</sup> ± 0,06	1,37 <sup>c</sup> ± 0,06
AML	1,10 <sup>a</sup> ± 0,00	1,60 <sup>b</sup> ± 0,00	1,90 <sup>c</sup> ± 0,00	2,17 <sup>d</sup> ± 0,06

\* T0 = 1ª hora de armazenamento, T7, T15 e T25 = 7, 15 e 25 dias de armazenamento.

\*\* AMC= água-de-coco com adição de *L. acidophilus*, AMS = água-de-coco sem adição de *L. acidophilus*, AML= água-de-coco com adição de *L. acidophilus* e *S. cerevisiae*.

\*\*\* Amostras dispostas em linha e seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Pesquisas envolvendo *L. acidophilus* em leites fermentados mostram baixo poder de acidificação por esta bactéria durante o período de armazenamento pós-processamento em refrigeração (THAMER; PENNA, 2005). Desta forma, os elevados valores encontrados na amostra AML, devem-se a acidificação provocada pela *S. cerevisiae*, que é um levedura heterofermentadora, produzindo etanol principalmente e ácidos orgânicos (BORZANI et al., 2001), além disso, segundo Franco e Landgraf (2003), as leveduras não resistem a temperaturas elevadas, preferindo faixa mesófila e psicrófila.

Segundo Gomes e Malcata (1999), o *L. acidophilus* é capaz de tolerar variações de acidez titulável entre 0,3 a 1,9 %, assim, mesmo em AML que apresentou maior acidificação durante a estocagem, a acidez não foi suficiente para causar sérias injúrias nas bactérias probióticas adicionadas.

### **Viabilidade celular da bactéria probiótica *L. acidophilus* adicionada em água-de-coco armazenada a 4° C.**

Os *Lactobacillus* pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico (LAB) que sintetizam ácido láctico como principal ou único produto de fermentação. O gênero é constituído por bacilos não esporulantes e cocos, ambos Gram-positivos, anaeróbios ou aerotolerantes e nutricionalmente fastidiosos (SILVA et al., 2007).

As bactérias lácticas probióticas conferem proteção contra patógenos, possivelmente dificultando a adesão destes e de toxinas às células epiteliais intestinais

produzindo metabólitos com ação antimicrobiana estimulando o sistema imune e/ou prevenindo doenças ligadas ao trato gastrointestinal, como intolerância à lactose, diarreia e constipação (DEMPSEY; CORR, 2022; ZIELIŃSKA; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, 2018).

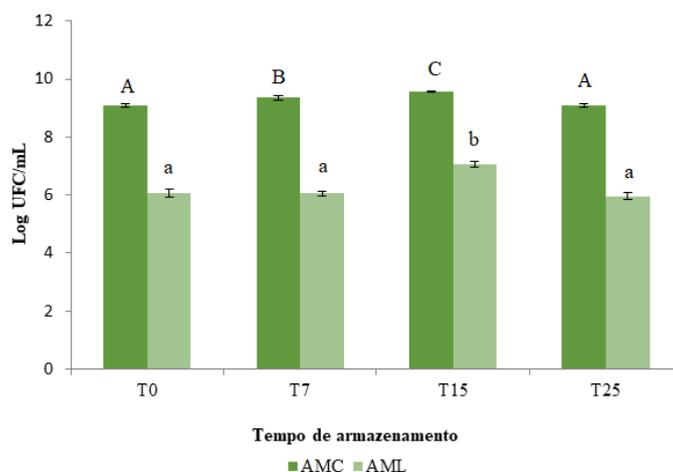
As espécies que integram o gênero *Lactobacillus* conseguem proliferar num meio semi-sintético contendo apenas lactose, alguns aminoácidos (cisteína, glicina e triptofano), vitaminas, nucleótidos e alguns minerais (HASSINEN et al., 1951). No que diz respeito ao *L. acidophilus*, os requisitos em nutrientes necessários para a exibição de taxas razoáveis de crescimento são semelhantes aos anteriormente referidos, além de hidratos de carbono como fonte de energia, proteínas e respectivos produtos de degradação, vitaminas do complexo B, derivados dos ácidos nucleicos e minerais (ex. magnésio, manganês e ferro) (MITAL; GARG, 1992).

A água-de-coco é ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fitormônios), fosfolipídio, além de outros compostos que possuem atividades semelhantes às aquelas citocininas que são derivadas das purinas (difêniluréia), com excelentes atividades biológicas para as células (MAHAYOTHEE et al., 2016). Esta bebida natural foi testada como base de um diluidor para a congelação de sêmen canino, observando-se uma motilidade de 50% após a descongelação (CARVALHO et al., 2006).

A lista de alegações de propriedade funcional para alimentos probióticos dada pela ANVISA (BRASIL, 2008) recomenda que o produto contenha no mínimo entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL por ingestão diária. Além disso, requer laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o prazo final de validade e teste de resistência da cultura à acidez gástrica e aos sais biliares, ou seja, uma avaliação *in vitro* preliminar (BRASIL, 2008).

A bactéria *L. acidophilus* manteve sua viabilidade superior a  $10^9$  UFC/mL na amostra AMC, mostrando que a água-de-coco foi viável na sua manutenção durante os 25 dias de armazenamento a 4°C (Gráfico 1). Em 7 e 15 dias de armazenamento em AMC houve aumento significativo da viabilidade da bactéria, mostrando provavelmente uma recuperação metabólica e fisiológica do micro-organismo liofilizado. Entretanto, em 25 dias o número viável foi estatisticamente igual ao tempo 0 de armazenamento.

**Gráfico 1-** Variação do Log de UFC de *L. acidophilus* em água-de-coco durante o armazenamento de 25 dias a 4°C.



AMC = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus*; AML = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus* e *S. cerevisiae*. \* Letras iguais em maiúsculo e em minúsculo mostram, respectivamente, que as variáveis do AMC e do AML não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

É possível observar que o *L. acidophilus* em AML manteve-se na ordem de  $10^6$  UFC/mL (6 LogUFC/mL) durante os 25 dias. Nota-se que em 15 dias este teve uma melhora de sua viabilidade chegando a 1 ciclo logarítmico. Como as águas-de-coco normalmente são comercializadas acima de 200 mL por embalagem, o probiótico atingiria no mínimo  $10^8$  UFC/embalagem, número mínimo recomendado por ingestão diária pela ANVISA. Entretanto, a amostra AML não representa uma condição real da água-de-coco comercial, sendo esta formulada principalmente para verificar se *L. acidophilus* inibiria uma grande concentração de leveduras.

Mesmo o inóculo de *L. acidophilus* tendo sido o mesmo, a viabilidade celular do probiótico em AMC foi em média 3 ciclos logarítmicos maior do que em AML durante todo o período de armazenamento (Gráfico 1). Tal diferença provavelmente ocorreu, pois 120 ppm de cetoconazol adicionado no meio PCA não inibiu completamente a levedura *S. cerevisiae* adicionada, havendo competição pelo mesmo substrato e exclusão competitiva. Segundo Redondo (2008) *L. acidophilus* tem diminuição de sua viabilidade através desses dois mecanismos.

O *L. acidophilus* cultivado em água-de-coco manteve viabilidade acima de  $10^6$  em 15 dias de armazenamento refrigerado no trabalho de Silva (2012), tendo queda considerável após 20 dias.

Prado (2007) mostrou que a contagem celular de uma linhagem de *Lactobacillus* de uma bebida fermentada a base de água-de-coco iniciou com  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL e oscilou até 28 dias de armazenamento. Após 28 dias diminuiu até 42 dias, atingindo contagem de

$7,4 \times 10^7$  UFC/mL. Macedo et al., (2008) mostrou que a viabilidade do *L. acidophilus* em  $10^8$  UFC/mL foi mantida mesmo após 46 dias de armazenamento do leite fermentado a 7° C.

A viabilidade de *L. acidophilus* foi testada em suco de uva com adição de oligofrutose por Santos (2008), porém esta só se manteve de acordo com a legislação ( $10^7$  UFC/mL) até o oitavo dia de armazenamento sob refrigeração.

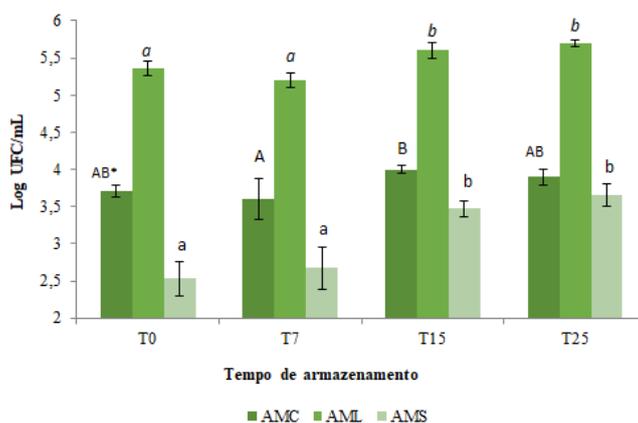
## Micro-organismos contaminantes nas amostras de água-de-coco

### Leveduras

A presença de micro-organismos contaminantes e principalmente de bolores e leveduras é indicativo de falha higiênico-sanitária, uma vez que a água-de-coco é estéril quando se encontra no interior do fruto e se mantém assim, desde que o fruto não sofra nenhuma lesão que permita a entrada de micro-organismos no seu interior (VENTURINI FILHO, 2010).

O Gráfico 2 mostra a variação do Log de UFC de levedura/mL na água-de-coco. Houve crescimento significativo deste micro-organismo entre T0 e T25 de 0,30, 0,34 e 1,13 ciclos logarítmicos, respectivamente, para AMC, AML e AMS.

**Gráfico 2** - Variação do Log de UFC de leveduras nas amostras de água-de-coco durante o período de armazenamento a 4°C.



AMC = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus*; AML = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus* e *S. cerevisiae*; AMS = água-de-coco comercial sem adição de *L. acidophilus*.

\*Letras iguais em maiúsculo, em itálico e em minúsculo mostram que os dados, respectivamente, do AMC, do AML e do AMS, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Em 25 dias de armazenamento, o crescimento das leveduras na amostra AMS (sem adição de probiótico) foi superior em 70 e 73% quando comparado,

respectivamente, com AML e AMC. Isto indica que a bactéria probiótica presente nas duas amostras contendo o probiótico competiu com as leveduras naturais da água-de-coco comercial refrigerada ou até mesmo com a *S. cerevisiae* adicionada, inibindo o crescimento destes fungos unicelulares. Assim, além destas bactérias poderem trazer efeitos benéficos à saúde do consumidor, elas podem estender a vida de prateleira da água-de-coco comercial refrigerada.

Culturas de *L. acidophilus plantarum* têm sido utilizadas para aumentar a vida-de-prateleira dos produtos lácteos e não lácteos, devido à formação de componentes metabólicos como ácido lático, ácido propiônico, diacetil e substâncias antagonistas que exercem efeito inibitório sobre as bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos responsáveis pela deterioração de produtos alimentícios e muitas vezes causadores de toxi-infecções (DANILOVA et al, 2022; GEORGE-OKAFOR et al., 2020). Segundo Silva (2012), *L. acidophilus* em água-de-coco provavelmente causou inibição das leveduras presentes nesta bebida.

### Mesófilos aeróbios

Outros micro-organismos contaminantes da água-de-coco comercial refrigerada foram os mesófilos aeróbios, estes puderam ser melhores visualizados através da amostra AMS (Tabela 4).

Tabela 4 - UFC de mesófilos aeróbios/mL da amostra AMS durante 25 dias de armazenamento a 4° C.

Amostra**	T0*	T7	T15	T25
AMS	2x10 <sup>6</sup>	18,3 x10 <sup>6</sup>	11,7 x10 <sup>6</sup>	25 x10 <sup>6</sup>

\* T0 = 1ª hora de armazenamento, T7, T15 e T25 = 7, 15 e 25 dias de armazenamento.

\*\* AMS = água-de-coco comercial sem adição de *L. acidophilus*.

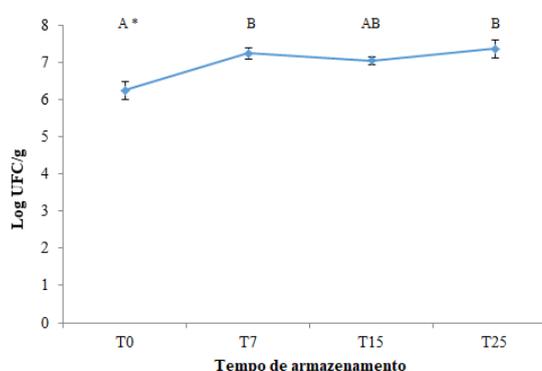
A *American Public Health Association* (2001) sugere um limite de 10<sup>4</sup> UFC de mesófilos aeróbios/mL de produto, entretanto a amostra avaliada mostrou concentrações acima dos valores indicados, indicando falhas higiênicas nos processamentos que a água-de-coco sofreu na indústria até seu envase, já que a matéria-prima mostra-se normalmente isenta de contaminações (VENTURINI FILHO, 2010).

A contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas, também denominados Contagem Padrão em Placas, é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Estes são utilizados para obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, prática de manufatura, matérias-primas utilizadas,

condições de processamento, manipulação e vida de prateleira. Não é indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Dependendo da situação, pode ser útil na avaliação da qualidade, porque populações altas de bactérias podem indicar falhas na sanitização ou no controle do processo ou dos ingredientes (FRANCO; LANDGRAF, 2003; SILVA et al., 2007).

No Gráfico 3 nota-se que houve aumento da viabilidade de mesófilos chegando a 1,12 ciclos logarítmicos em 25 cinco dias de estoque em refrigeração. Este crescimento ocorreu provavelmente por parte dos mesófilos serem psicrotróficos, ou seja, terem adaptações para o crescimento em temperaturas de refrigeração.

**Gráfico 3** - Variação do Log de UFC de mesófilos na amostra AMS durante o período de armazenamento a 4°C.



AMS = água-de-coco comercial sem adição de *L. acidophilus*.

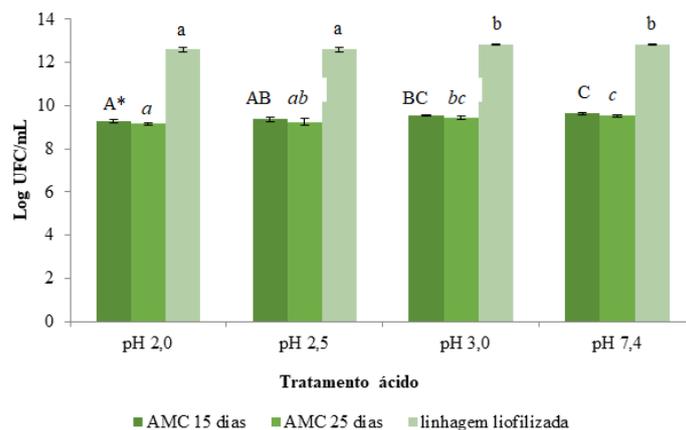
\* Amostras seguidas da mesma letra não diferem pelo teste T-Student ( $p < 0,05$ ).

### Resistência de *L. acidophilus* da amostra AMC aos sais biliares e HCl

A viabilidade de cepas probióticas é considerada importante a fim de assegurar sua ótima funcionalidade. Após a ingestão, estas bactérias devem superar duas barreiras biológicas principais, o ambiente ácido do estômago e a secreção de bile no duodeno (LANKAPUTHRA; SHAH, 1995). Para atingir o intestino e garantir sua funcionalidade, as bactérias probióticas devem possuir uma ou mais características, como resistência ao suco gástrico, à bile e às condições de processamento as que o alimento é submetido (MATILLA-SANDHOLM et al., 2003).

O pH gástrico é ácido, com valores que variam entre 1,0 e 4,5 (METHENY et al., 2019). Não existem regras combinadas para análise de tolerância ácida, para estirpes probióticas. Valores de pH de 1 a 5 têm sido usados para análise *in vitro* de tolerância ácida de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (URNAU et al., 2012).

**Gráfico 4** - Log UFC/mL de *L. acidophilus* após o tratamento com HCl.



AMC 15 dias = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus* armazenados durante 15 dias; AMC 25 dias = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus* armazenados durante 25 dias; Linhagem liofilizada = *L. acidophilus* comercial.

\*Letras iguais em maiúsculo, em itálico e em minúsculo mostram que os dados, respectivamente, do AMC 15 dias, do AMC 25 dias e linhagem liofilizada, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

O Gráfico 4 mostra que o tratamento com HCl exerceu maior inibição da viabilidade celular do probiótico em pH 2,0 por 2 horas quando comparado com o pH 7,4; com diminuição significativa de 0,37; 0,39 e 0,23 ciclos logarítmicos, respectivamente, para AMC 15 dias, AMC 25 dias e linhagem liofilizada. Mesmo nesta condição, *L. acidophilus* em água-de-coco permaneceu com a viabilidade acima de  $10^9$  UFC/mL (9 Log UFC/mL).

Os dias de armazenamento 15 e 25 dias não interferiram significativamente (Test T-Student,  $p > 0,05$ ) na resistência à acidez do *L. acidophilus*.

Andrighetto e Gomes (2003) ao tratarem *L. acidophilus* de picolés acidófilos com 0,01N de HCL por 2 horas verificaram diminuição de 0,65, 1,04 e 1,08 ciclos logarítmicos, respectivamente, para 20, 40 e 60 dias de armazenamento a  $-25^{\circ}$  C.

Cada linhagem microbiana tem uma tolerância ao pH ácido, sendo que as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são mais resistentes (ANDRIGHETTO; GOMES, 2003). Não existe um mecanismo devidamente esclarecido, sendo, contudo, citada na literatura a influência de uma enzima específica, a  $H^+$ ATPase de membrana (TAKAHASHI et al., 2007).

Segundo Matsubara (2001), a literatura sugere que o número de células viáveis de probióticos que deve atingir o intestino é cerca de 3 a 4 log de UFC, mas este recomenda como número ideal 6 log de UFC. Dessa forma, mesmo o indivíduo tendo elevada acidez estomacal, ao ingerir no mínimo 11 log de UFC de *L. acidophilus* em 290 mL de água-de-coco e este tendo a diminuição média de 0,38 ciclos logarítmicos após a passagem

pelo estômago, este chegaria no intestino em número suficiente para desempenhar seus efeitos probióticos.

A sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal é dependente tanto da estirpe quanto da matriz alimentar envolvida no produto probiótico (FLORENCE et al., 2016). A matriz alimentar em que o probiótico é veiculado pode protegê-lo das condições adversas encontradas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (PACHECO et al., 2010).

O duodeno, no início do intestino delgado, também apresenta condições adversas às bactérias probióticas, em virtude da presença de sais biliares (PACHECO et al., 2010). A concentração de 0,15-0,3% de sais biliares tem sido recomendada como adequada para seleção de bactéria probiótica, para uso em humanos (URNAU et al., 2012.).

A bile pode promover a morte de micro-organismos, impedindo sua implantação no trato intestinal. Por isso, um micro-organismo probiótico deve resistir à ação da bile para atingir porções distais do intestino e colonizá-lo (GIBSON; FULLER, 2000).

O mecanismo de tolerância aos sais biliares ainda não é bem entendido e é difícil definir uma concentração máxima a que um micro-organismo deva suportar para ser considerado bile-resistente, uma vez que a concentração desta substância não é estática, ela varia em função do tempo e em diferentes partes do intestino (LANKAPUTHRA; SHAH, 1995). Após uma refeição, a concentração de sais biliares aumenta rapidamente no duodeno, alcançando uma concentração de aproximadamente 15 mmol/L e vai diminuindo progressivamente até 5 mmol/L. No jejuno, a concentração de sais biliares é de aproximadamente 10 mmol/L e, no íleo, cai para 4 mmol/L devido à sua absorção ativa nesta porção intestinal (URNAU et al., 2012). Redondo (2008) argumenta que os sais biliares formam micelas com os fosfolipídios e, deste modo, possuem uma menor atividade antibacteriana que as soluções artificiais de sais biliares puras.

Mesmo as bactérias probióticas sendo resistentes aos sais biliares quando estas são adicionadas em alimentos, durante seu processamento podem sofrer injúrias e deixarem de exercer seus efeitos benéficos (SAAD, CRUZ, FARIA, 2011).

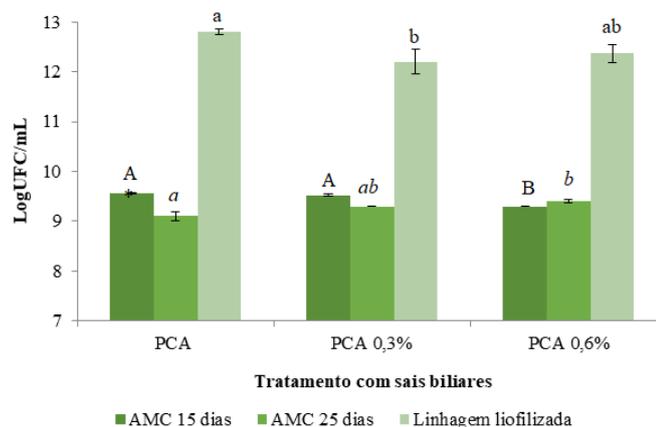
O Gráfico 5 mostra a viabilidade do *L. acidophilus* em 0,0; 0,3 e 0,6% de sais biliares após armazenamento em 15 e 25 dias à 4° C e da linhagem liofilizada.

A bactéria probiótica adicionada em água-de-coco permaneceu na ordem de 10<sup>9</sup> UFC/mL (9 Log UFC/mL) após o tratamento com os sais biliares apresentando-se dentro dos requisitos pré-estabelecidos pela legislação vigente.

*L. acidophilus* da amostra AMC 15 dias sofreu diminuição significativa de 0,26 ciclos logarítmicos quando cultivado em PCA 0,6% de sais biliares em relação ao PCA controle, mostrando assim pequena sensibilidade a esta concentração. Entretanto, 0,3% de sais biliares não afetou a viabilidade da bactéria estudada, pois não houve diferença significativa com o controle.

O tempo de armazenamento de 25 dias interferiu apenas na viabilidade celular a 0,3% de sais biliares, tendo uma diminuição significativa (Teste T-Student,  $p < 0,05$ ) de apenas 0,23 ciclos logarítmicos quando comparado com 15 dias de armazenamento.

**Gráfico 5** - Log de UFC de *L. acidophilus* após o tratamento com sais biliares.



AMC 15 dias = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus* armazenados durante 15 dias; AMC 25 dias = água-de-coco comercial com adição de *L. acidophilus* armazenados durante 25 dias; Linhagem liofilizada = *L. acidophilus* comercial.

\*Letras iguais em maiúsculo, em itálico e em minúsculo, mostram que os dados, respectivamente, do AMC 15 dias, do AMC 25 dias e linhagem liofilizada, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

A linhagem padrão mostrou tendência de diminuição da viabilidade celular em função da presença de sais biliares, embora tenha havido diferença significativa em relação ao PCA controle somente em 0,3% de sais biliares, havendo a redução de 0,6 ciclos logarítmicos. Verifica-se assim, que a diminuição em ciclos logarítmicos da linhagem liofilizada foi no geral maior do que a linhagem adicionada à água-de-coco em função dos sais biliares (Gráfico 5).

Prado (2007) ao produzir e patentear bebida à base de água-de-coco fermentada demonstrou que esta matéria-prima pode ser utilizada como substrato para o crescimento de bactérias probióticas, as quais mantiveram viabilidade celular em níveis desejáveis por 28 dias de armazenamento refrigerado. De acordo com Carvalho et al., (2006), a água-de-coco apresenta composição de aminoácidos que se assemelha com a do leite, mas que possui uma quantidade maior de arginina, alanina, cistina e serina do que este. Em estudos

preliminares Silva (2012) ao adicionar *Lactobacillus acidophilus* em diferentes bebidas, verificou que esta bactéria manteve a mesma viabilidade celular em leite e em água-de-coco durante 15 dias de armazenamento. Após análise sensorial por 60 provadores não treinados a água-de-coco com adição de *L. acidophilus* foi tão aceita quanto à água-de-coco sem adição.

Com estes resultados pode-se considerar que mesmo havendo diminuição da viabilidade de *L. acidophilus* adicionada em água-de-coco em função de sais biliares, esta foi pequena, podendo-se considerar que a bactéria, no geral, foi resistente a esta substância, já que continuou em quantidades requeridas por legislação e mostrou maior resistência do que na linhagem liofilizada.

Andrighetto e Gomes (2003) ao produzirem picolés usando leite fermentado por *L. acidophilus*, também verificaram que esta bactéria resistiu aos sais biliares a 0,3 e 0,6%, embora esta tenha apresentado maior crescimento para a concentração mais baixa.

## CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a água-de-coco refrigerada pode ser um veículo para o probiótico *L. acidophilus*, já que a viabilidade desta bactéria se manteve adequada à legislação durante o período de armazenamento, aos tratamentos com ácido clorídrico e com sais biliares.

A bactéria probiótica causou inibição de leveduras contaminantes da água-de-coco, o que pode contribuir para aumento de vida de prateleira do produto, além de ser uma alternativa viável aos intolerantes ou alérgicos ao leite.

## REFERÊNCIAS

ALGAITHI, M. *et al.* *Lactobacillus reuteri*-fortified camel milk infant formula: Effects of encapsulation, in vitro digestion, and storage conditions on probiotic cell viability and physicochemical characteristics of infant formula. **Journal Dairy Science**, v. 105, n. 11, p. 8621-8637, 2022.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, D.C., 2001. 676 p.

ANDRIGHETTO, C.; GOMES, M. I. F. V. Produção de Picolés Utilizando Leite Acidófilo. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 267-271, jul./dez., 2003.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: A.O.A.C., 1995. chapter 33. p. 10-12.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 3ª ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões de Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Disponível em: <[http://www.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 18 nov 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. 2009. Disponível em: <[http://www.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 18 nov 2022.

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

DANILOVA, T. A.; DANILINA, G. A.; ADZHIEVA, A. A.; POLYAKOV, N. B.; ZHUKHOVITSKII, V. G. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* supernatant on non-fermenting Gram-negative bacteria. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 173, p. 59-62, 2022.

DEMPSEY, E.; CORR, S. C. *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. **Front Immunol**, v. 13, p. 840245, 2022.

FLORENCE, A. C. R.; OLIVEIRA, M. N.; DELILE, A.; BÉAL, C. Survival of *Bifidobacterium* strains in organic fermented milk is improved as a result of membrane fattyacid composition. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 1-9, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf). Acesso em: 10 de dez 2022.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 182.

GEORGE-OKAFOR, U.; OZOANI, U.; TASIE, F.; MBA-OMEJE, K. The efficacy of cell-free supernatans from *Lactobacillus plantarum* Cs and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 for the preservation of home-processed tomato-paste. **Scientific African**, v. 8, e.00395, p.1-9, 2020.

GIBSON, G. R. e FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, s. 2s, p. 391S-395S, 2000.

GOCER EMC, ERGIN F, KÜCÜKCETIN IO, KÜCÜKCETIN A. In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* in some dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2319-2334, 2021.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Boletim Biotecnologia**, n. 64, p. 12-22, 1999.

GONÇALVES, L.. C., GUIMARAES, T. C., SILVA, R. M. *et al.* Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. **Allergology Immunopathology (Madr)**, v. 44, n. 6, p. 497-503, 2016.

HASSINEN, J. B., DURBIN, G. T., TOMARELLI, R. M. E BERNHART, F. W. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, p. 771-777, 1951.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985.

KIEPŚ, J.; DEMBCZYŃSKI, R. Current Trends in the Production of Probiotic Formulations. **Foods**, v. 11, n. 15, p. 2330, 2022.

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 30, n. 3, p. 2-7, 1995.

LOURENÇO DA SILVA JÚNIOR, E.; GONZALEZ, L. F. C. A importância dos probióticos para o sistema imunológico. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, s. 1, p. 1-8, 2022.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is “healthier”? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 7/8, p. 751-759, 2004.

MACEDO, L. N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C. G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MAHAYOTHEE, B., KOOMYART, I., KHUWIJITJARU, P. *et al.* Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water

and meat at different maturity stages. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 9, p. 2041-2051, 2016.

MATILLA-SANDHOLM, T. et al., Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2003.

MATSUBARA, S. Alimentos Funcionais: uma tendência que abre perspectivas aos laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 34, p. 10-18, 2001.

METHENY, N. A. et al. A review of guidelines to distinguish between gastric and pulmonary placement of nasogastric tubes. **Heart Lung**, v. 48, n. 3, p. 226-235, 2019.

MITAL, B. K. e GARG, S. K.. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. **Food Reviews International**, v. 8, p 347-389, 1992.

NWARU, B. I., HICKESTEIN, L., PANESAR, S. S. *et al.* Prevalence of common food allergies in Europe - Systematic review and meta-analysis. **Allergy**, v. 69, n. 8, p. 992-1007, 2014.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2336-2341, 2002.

PACHECO, K. C.; TORO, G. V.; MARTÍNEZ, F. R.; DURÁN-PÁRAMO, E. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* Under Human Gastrointestinal Conditions Simulated *In Vitro*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.1, p. 37-42, 2010.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de água de coco**. 2007. 183 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e de *Lactobacillus helveticus* spjigurti 416**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2008.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G. da; FARIA, J. de A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011, 669p.

SANTOS, J.S. dos. Suco de uva suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 839-844, out./dez. 2008.

SANTOS, P. S.; ALMEIDA, E. B. D.; LACERDA, L. G. et al. Consumo de probióticos e os benefícios para a saúde. **Revista Cereus**, v. 12, n. 1, p. 2-15, 3 abr. 2020.

SILVA, V. S.; ORLANDELLI, R. C. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 182–194, 2019.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, T.M.S. da. **Água-de-coco com adição de probióticos *Lactobacillus Acidophilus***. 2012. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Alimentos, Faculdade de Tecnologia “Estudante Rafael Almeida Camarinha”, Marília, SP, 2012.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, T.; ICHISAKA, K.; TOMODA, S.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, n. 5, p 861–872, 2007.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005.

THIRABUNYANON, M.; BOONPRASOM, P.; NIAMSUP, P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters*, v. 31, n.4, p. 571–576, 2009.

ULATE, O. H. **Escaliamiento a nível semi-industrial de la producción de uma bebida de agua de coco (*Cocos nucifera* L.) microfiltrada adicionada con el cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* (cepa CRL431®)**. Monografia (Graduação). Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. San José, Costa Rica. 2017. 129 p.

URNAU, D. et al. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. *Revista Instituto Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 67, n. 384, p. 5-10, 2012.

VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia**. 2ª ed. São Paulo: Editora Blucher, 2010.

ZACARCHENGO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, 674-679, 2004.

ZIELIŃSKA, D.; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *Biomed Research International*, v. 2018, n. 50633185, p. 1-15, 2018.

*Recebido em: 10/11/2022*

*Aprovado em: 15/12/2022*

*Publicado em: 29/12/2022*