

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

MARIA CAROLINA MESQUITA DOS SANTOS

BEBIDA DE GRÃO-DE-BICO E COCO FERMENTADA POR *Lactobacillus paracasei*
subsp. *paracasei* LBC 81 ELABORADA COM DIFERENTES TEORES DE AÇÚCAR

BRASÍLIA

2020

MARIA CAROLINA MESQUITA DOS SANTOS

BEBIDA DE GRÃO-DE-BICO E COCO FERMENTADA POR *Lactobacillus paracasei*
subsp. *paracasei* LBC 81 ELABORADA COM DIFERENTES TEORES DE AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Braz Assunção Botelho

Coorientadora: Profa Dra. Eliana dos Santos Leandro

BRASÍLIA

2020

MARIA CAROLINA MESQUITA DOS SANTOS

BEBIDA DE GRÃO-DE-BICO E COCO FERMENTADA POR *Lactobacillus paracasei*
subsp. *paracasei* LBC 81 ELABORADA COM DIFERENTES TEORES DE AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada em:

MEMBROS DA BANCA

Profa. Dra. Raquel Braz de Assunção Botelho
(Presidente da Banca – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda
(Membro Interno – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Sascha Habu
(Membro Externo – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Prof. Dr. Márcio Antônio Mendonça
(Suplente – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA

2020

Maria Carolina Mesquita dos Santos

Bebida de grão-de-bico e coco fermentada por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 elaborada com diferentes teores de açúcar/ Maria Carolina Mesquita dos Santos

Dissertação de mestrado/ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2020.

Área de Concentração: Nutrição Humana

Orientadora: Dra. Raquel Braz de Assunção Botelho

Coorientadora: Dra. Eliana dos Santos Leandro

1.Bactéria láctica 2.Probiótico 3.Bebida fermentada 4. Bebida vegetal 5.Grão-de-bico 6.Coco.

AGRADECIMENTOS

Primeiro quero agradecer a Deus por me dar equilíbrio e força para chegar até aqui. Nada foi fácil, sei que ao longo desse processo o Senhor me fez compreender que, quando damos tudo de si, podemos chegar a lugares além do imaginado.

Agradeço imensamente a minha família, em especial minha mãe Eliane Mesquita e ao meu pai Genildo Lopes, parte dessa conquista devo a vocês. Obrigada pelo incentivo, por acreditarem no meu potencial, quando existiam dúvidas por minha parte. Obrigada por sempre estarem do meu lado e me compreenderem. Vocês são a maior inspiração de que através de muito esforço, persistência e coragem, podemos sim fazer dos sonhos realidade. Amo vocês, sei que desde o início fizeram o melhor por mim.

Quero agradecer ao meu namorado Gabriel Paiva, pelas palavras de conforto, por me trazer calma e por sempre me incentivar. Obrigada por estar ao meu lado e comemorar cada meta cumprida como fizesse parte das suas. Obrigada por me deixar compartilhar os momentos dessa trajetória com você.

Agradeço a minha orientadora Raquel Botelho e coorientadora Eliana Leandro, por confiarem no meu trabalho e por me incentivarem. O conhecimento adquirido ao lado de vocês neste processo não se pode mensurar, vocês são indubitavelmente o melhor exemplo de profissionais, além de amarem o que fazem, compartilham as experiências e sabedoria da melhor forma. Obrigada por toda paciência e por me darem a honra de produzirmos ciência juntas. Me espelho em vocês!

Meu muito obrigada a todos os professores que me auxiliaram, mas principalmente aos professores Ernandes de Alencar e Márcio Mendonça, por generosamente abrirem as portas do Laboratório de Análise de Alimentos para mim e fazerem dos períodos de análises, momentos de descontração. Ao lado de vocês esse processo se tornou mais leve.

Agradeço as minhas amigas Isabela, Priscila, Fernanda e Lilian, por escutarem meus desabafos, por me ajudarem e compreenderem como ninguém os desafios enfrentados nesta caminhada. Obrigada meninas, por me apoiarem de tal forma a me fazer sentir que nunca estive sozinha nessa.

Obrigada a todos os técnicos de laboratório do Departamento de Nutrição, que gentilmente me auxiliaram nas análises deste trabalho, e a aluna Noemi por toda ajuda nesta fase.

Muito obrigada a CAPES pela bolsa de estudos e principalmente ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana por toda experiência vivida e conhecimento adquirido.

Meu muito obrigada a todos!

“Não se acomode diante das situações, coloque dedicação e tenha força de vontade. Esse é o segredo do sucesso.”

Genildo Lopes

RESUMO

As bebidas vegetais constituem um mercado global em constante expansão, devido a busca por alternativas ao leite de vaca e o aumento do número de vegetarianos e veganos. A fermentação dessas matrizes por bactérias lácticas pode agregar maior funcionalidade ao produto, em decorrência do aprimoramento das características nutricionais, sensoriais e de segurança do alimento, além do surgimento de componentes bioativos com efeitos benéficos para a saúde. A preocupação com a saúde e o bem-estar tem despertado o interesse por alimentos que apresentem alegações de propriedades funcionais para o organismo. O grão-de-bico possui oligossacarídeos, compostos antioxidantes e aminoácidos livres; o coco apresenta minerais como ferro, magnésio e zinco, e compostos antioxidantes, devido aos constituintes químicos dessas matrizes, poderiam servir como substratos em processos de fermentação por bactérias lácticas. O objetivo principal deste estudo foi elaborar bebidas fermentadas de grão-de-bico e coco com diferentes teores de açúcar. Uma bebida composta por 90% extrato de grão-de-bico e 10% extrato de coco foi escolhida para elaboração de cinco formulações, com 0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10% de açúcar. As formulações foram inoculadas com 4% da cultura ativa e foram avaliadas quanto a cinética de crescimento do micro-organismo, por meio da determinação do pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. Posteriormente foi avaliada a composição química e a concentração de sódio, cálcio e potássio, e análise de cor e estabilidade das formulações durante armazenamento a 4°C por 10 dias. A sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em bebida fermentada de grão-de-bico e coco com 10% de açúcar foi avaliada com 1 e 8 dias de armazenamento refrigerado após exposição ao estresse gastrointestinal *in vitro*. Os resultados foram comparados com a sobrevivência obtida em suspensão de células em solução salina e/ou suspensão de células em bebida de grão-de-bico e coco. *L. paracasei* LBC 81 apresentou excelente crescimento nas formulações de bebida de grão-de-bico e coco, com contagem média final de $8,60 \pm 0,17$ log UFC/mL. Os distintos teores de açúcar proporcionaram aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade de carboidrato e valor energético das formulações. Durante armazenamento refrigerado, a viabilidade do micro-organismo apresentou valor estimado superior a 8 log UFC/mL, com tendência de aumento no período, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações. Houve tendência de aumento da acidez titulável, estabilidade dos sólidos solúveis totais e mudanças nos parâmetros de tonalidade e saturação de cor, devido a interação dos teores de açúcar e tempo de armazenamento das formulações. A estirpe *L. paracasei* LBC 81 em bebida fermentada de grão-de-bico e coco apresentou alto percentual de sobrevivência após exposição ao suco gástrico simulado, e sucos gástrico e pancreático em condições sucessivas, com valores de $99,47 \pm 2,05\%$, $93,21 \pm 0,43\%$, respectivamente, destacando o efeito protetor da matriz. O armazenamento a 4 °C por 1 e 8 dias não afetou a sobrevivência do micro-organismo na bebida fermentada após exposição ao estresse gastrointestinal *in vitro*. A bebida com 90% extrato de grão-de-bico e 10% extrato de coco é uma excelente matriz para o crescimento de *L. paracasei* LBC 81, o

açúcar adicionado à bebida, não foi um fator determinante para que ocorresse o crescimento microbiano. A bebida fermentada proporcionou efeito protetor ao micro-organismo após exposição ao suco gástrico simulado, e aos sucos gástrico e pancreático em condições sucessivas. Assim sugere-se que a bebida com 90% extrato de grão-de-bico e 10% extrato de coco fermentada pode ser uma nova alternativa a leites fermentados.

Palavras-chave: bactéria láctica; probiótico; bebida fermentada; bebida vegetal; grão-de-bico; coco.

ABSTRACT

Plant-based beverages constitute a constantly expanding global market, due to the search for alternatives to cow milk and the increase in the number of vegetarians and vegans. The fermentation of these matrices by lactic bacteria can add greater functionality to the product, as a result of the improvement of the nutritional, sensory and safety characteristics of the food, in addition to the presence of bioactive components with beneficial health effects. The concern with health and well-being has aroused interest in foods that have claims of functionality for the body. Chickpeas have oligosaccharides, antioxidant compounds and free amino acids; coconut has minerals such as iron, magnesium and zinc, and antioxidant. Due to the chemical constituents of these matrices, they could serve as substrates in fermentation processes by lactic acid bacteria. The main objective of this study was to elaborate fermented chickpea and coconut beverage with different contents of sugar. A beverage composed of 90% chickpea extract and 10% coconut extract was chosen for the preparation of five formulations, with 0%, 2.5%, 5.0% 7.5% and 10% of sugar. The formulations were inoculated with 4% of the active culture and were evaluated for growth kinetics of the microorganism, by determining the pH, titratable acidity, total soluble solids, and the viability of *L. paracasei* LBC 81. Subsequently, the chemical composition was evaluated as well as the concentration of sodium, calcium and potassium, and the analysis of color and stability of the formulations during storage at 4°C for 10 days. The survival of *L. paracasei* LBC 81 in a fermented chickpea and coconut beverage with 10% sugar was evaluated with 1 and 8 days of cold storage after exposure to gastrointestinal stress *in vitro*. The results were compared with the survival obtained in cells suspension in saline solution and/or cells suspension in chickpeas and coconut beverage. The *L. paracasei* LBC 81 showed excellent growth in formulations of chickpea and coconut beverage, with final mean count of 8.60 ± 0.17 log CFU/mL. The different levels of sugar provided a significant increase ($p < 0.05$) in the amount of carbohydrate and energy value of the formulations. During cold storage, the viability of the microorganism showed an estimated value greater than 8 log CFU / mL, with a tendency to increase in the period, with no significant difference ($p > 0.05$) among the formulations. There was a tendency to increase the titratable acidity, stability of the total soluble solids and changes in the parameters of hue angle and color saturation, due to the interaction of the sugar contents and storage time of the formulations. The strain *L. paracasei* LBC 81 in fermented chickpea and coconut beverage showed a

high survival percentage after the exposure to simulated gastric juice, and gastric and pancreatic juices in successive conditions, with values of $99.47 \pm 2.05\%$, $93.21 \pm 0.43\%$, respectively, highlighting the protective effect of the matrix. Storage at 4 °C for 1 and 8 days did not affect the survival of the microorganism in the fermented beverage after the exposure to gastrointestinal stress *in vitro*. The beverage of 90% chickpea extract and 10% coconut extract is an excellent matrix for the growth of *L. paracasei* LBC 81, the sugar added to the beverage was not a determining factor for microbial growth. The fermented beverage provided a protective effect to the microorganism after exposure to simulated gastric juice, and gastric and pancreatic juices in successive conditions. Thus, it is suggested that the beverage of 90% chickpea extract and 10% coconut extract may be a new alternative to fermented milk.

Keywords: lactic acid bacteria; probiotic; fermented beverage; plant-based beverage; chickpea; coconut.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vias metabólicas das bactérias lácticas (BAL), processos homofermentativo e heterofermentativo a partir da degradação da glicose. Fonte adaptada de Bintsis (2018).....27
- Figura 2.** Curvas de regressão de pH (A), acidez titulável (AT) em g/100 g de ácido láctico (B) e sólidos solúveis totais em °Brix (SST) (C) em relação ao período de fermentação das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por *L. paracasei* LBC 81.....58
- Figura 3.** Viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 (log UFC/mL) nas diferentes formulações de bebida fermentada de grão-de-bico e coco elaboradas com diferentes teores de açúcar. Os valores médios de viabilidade (log UFC/mL) correspondem ao armazenamento das formulações durante 10 dias a 4 °C.....66
- Figura 4.** Valores médios de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 (log UFC/mL) nas formulações de bebidas fermentadas de grão-de-bico e coco durante o armazenamento de 10 dias a 4 °C. Os valores médios de viabilidade (log UFC/mL) são independentes do teor de açúcar utilizado.....67
- Figura 5.** Valores médios de pH das diferentes formulações de bebida de grão-de-bico e coco fermentadas por *L. paracasei* LBC 81 durante 10 dias de armazenamento a 4 °C. Os valores médios de pH são independentes do teor de açúcar utilizado.....69
- Figura 6.** Acidez titulável em g/100 g de ácido láctico (AT) (A) e sólidos solúveis totais em °Brix (SST) (B) durante 10 dias de armazenamento a 4 ° C das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por *L. paracasei* LBC 81.....70
- Figura 7.** Tonalidade de cor (h^* , A) e croma ou saturação de cor (C^* , B) durante 10 dias de armazenamento a 4 °C das diferentes formulações de bebida de grão-de-bico e coco elaboradas com diferentes teores de açúcar.....73
- Figura 8.** Porcentagem de sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em suspensão de células em solução salina (SCSS), bebida de grão-de-bico e coco fermentada (BGCF) e suspensão de células na bebida de coco e grão-de-bico (SCGB), após exposição ao suco gástrico simulado (A), suco pancreático simulado (B) e exposição aos sucos gástrico e pancreático em condições sucessivas (C)75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais alimentos probióticos lácteos e não lácteos.....	24
Tabela 2. Composição nutricional do grão-de-bico por 100 g do produto cozido	38
Tabela 3. Equações de regressão de pH, acidez titulável (TA, g/100g de ácido láctico) e sólidos solúveis totais (SST, °Brix) durante período de fermentação (x) das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por <i>L. paracasei</i> LBC 81.....	59
Tabela 4. Composição química das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por <i>L. paracasei</i> LBC 81.....	63
Tabela 5. Equações de regressão relacionadas a viabilidade (log UFC/mL) e pH das diferentes formulações de bebidas fermentadas de grão-de-bico e coco, e com diferentes teores de açúcar em função do tempo de armazenamento (x)	67
Tabela 6. Equações de regressão relacionadas a acidez titulável (TA, g / 100 g de ácido láctico), sólidos solúveis totais (SST, °Brix), tonalidade de cor (h*) e saturação de cor (C*) das diferentes formulações de bebida de grão-de-bico e coco, em função do teor de açúcar (x) e do tempo de armazenamento (y)	71
Tabela 7. Sobrevivência (%) de <i>L. paracasei</i> LBC 81 durante armazenamento refrigerado a 4 °C de BFGC e SCGC, após condições gastrointestinais simuladas.....	79

LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT – Acidez titulável

BAL - Bactérias lácticas

BGCF - Bebida de grão-de-bico e coco fermentada

BSH - Enzimas que hidrolisam os sais biliares

C* - Croma ou saturação de cor

DHA - Ácido docosaexaenoico

DII - Doença inflamatória intestinal

EMP - Via Embden-Meyerhof-Parnas

EPA – Ácido eicosapentaenoico

FOS – Frutooligossacarídeos

FOSHU - Alimentos para uso específicos de saúde

GOS - Galacto-oligossacarídeo

h* - Hue angle ou tonalidade de cor

IFN- γ - Interferon gama

NK - Células natural killers

PSE - Polissacarídeos extracelulares

SCGC - Suspensão de células em bebida de grão-de-bico e coco

SCSS - Suspensão de células em solução salina

SII - Síndrome do intestino irritável

SST – Sólidos solúveis totais

TGI - Trato gastrointestinal

UFC - Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES	xii
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. OBJETIVOS.....	18
1.1.1. Objetivo geral.....	18
1.1.2. Objetivos específicos.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Alimentos funcionais	19
2.2. Micro-organismos probióticos	21
2.3. Probióticos em alimentos.....	22
2.3.1. Bactérias lácticas (BAL) e metabolismo fermentativo	26
2.3.1.1. <i>Lactobacillus paracasei</i>	28
2.3.2. Bebidas fermentadas probióticas.....	30
2.3.3. Viabilidade de probióticos incorporados em diferentes matrizes alimentares após exposição às condições gastrointestinais simuladas.....	31
2.4. Extratos vegetais	35
2.5. Grão-de-bico	37
2.6. Coco	41
3. METODOLOGIA.....	44
3.1. Tipo de estudo.....	44
3.2. Elaboração dos extratos vegetais	44
3.2.1. Elaboração do extrato vegetal de grão-de-bico	44
3.2.2. Elaboração do extrato vegetal de coco	45
3.2.3. Elaboração das diferentes formulações de bebida vegetal à base dos extratos de grão-de-bico e de coco	45
3.3. Elaboração da bebida fermentada	46
3.3.1. Preparo da cultura estoque de <i>L. paracasei</i> LBC 81	46
3.3.2. Determinação do inóculo de <i>L. paracasei</i> LBC81 para elaboração das bebidas fermentadas	47

3.3.3. Determinação da cinética de crescimento	47
3.3.3.1. pH	48
3.3.3.2. Acidez titulável.....	48
3.3.3.3. Sólidos Solúveis Totais	49
3.3.3.4. Determinação da viabilidade	49
3.4. Caracterização química das bebidas	49
3.4.1. Umidade	49
3.4.2. Proteína.....	51
3.4.3. Lipídio	51
3.4.4. Resíduo mineral.....	51
3.4.5. Carboidrato e valor energético	52
3.4.6. Teor de sódio, potássio e cálcio	52
3.5. Caracterização das bebidas durante armazenamento refrigerado	53
3.6. Determinação da sobrevivência de <i>L. paracasei</i> LBC 81 na bebida à base de grão-de-bico e coco após exposição a condições de estresse gastrointestinal <i>in vitro</i>	54
3.6.1. Determinação da sobrevivência após exposição ao suco gástrico simulado.....	54
3.6.2. Determinação da sobrevivência após exposição ao suco pancreático simulado.....	55
3.6.3. Determinação da sobrevivência após exposição aos sucos gástrico e pancreático em condições sucessivas	56
3.6.4. Determinação da porcentagem de sobrevivência	56
3.7. Análise estatística dos resultados.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Cinética de crescimento	58
4.2. Composição química.....	62
4.3. Caracterização das diferentes formulações de bebidas de grão-de-bico e coco durante estocagem.....	66
4.4. Sobrevivência de <i>L. paracasei</i> LBC 81 em bebida fermentada de grão-de-bico e coco após exposição ao estresse gastrointestinal <i>in vitro</i>	74
CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

A promoção da saúde e, conseqüentemente, a prevenção de doenças, como diabetes, hipertensão, dislipidemias e neoplasias, tem despertado o interesse da sociedade moderna por alimentos que apresentem além da condição básica de nutrir, alegações de propriedades funcionais para a saúde. Algumas bebidas podem ser consideradas funcionais, a depender dos componentes bioativos presentes no produto; e podem ser adaptadas para atender a necessidade de um grupo consumidor específico (ASHAOLU, 2020; DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020).

As bebidas vegetais constituem um mercado global em constante expansão. Previsões apontam crescimento anual de mais de 14% entre 2018 e 2024 (ANGELINO et al., 2020). Grande parte desse crescimento está associado ao aumento de pessoas adeptas ao vegetarianismo ou veganismo e as restrições alimentares, como a alergia a proteína do leite de vaca, acometendo 3,5% de crianças, e intolerância à lactose, observada em 15 a 75% dos adultos, podendo chegar a 100% como na população de origem asiática (VANGA; RAGHAVAN, 2018). Este público por motivo de restrição alimentar ou por questões ideológicas acabam não consumindo o leite de vaca e optam por alternativas de origem vegetal (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016).

A soja é comumente utilizada para elaboração de bebida vegetal, por fornecer teor proteico similar ao do leite de vaca. Contudo seu consumo é limitado, pois 14% dos indivíduos que possuem alergia a proteína do leite de vaca, também apresentam reação adversa a soja (MIN et al., 2018). Outras alternativas presentes no mercado incluem a bebida de arroz (0,91 g/100 mL PTN), de aveia (0,65 g/100 mL PTN), de quinoa (0,49 g/100 g PTN) e de amêndoas (1,37 g/100 g PTN), porém apresentam pouco conteúdo proteico quando comparadas ao leite de vaca (3,28 g/100 g PTN) e ao extrato de soja (3,72 g/100 g PTN) (FACCIN et al., 2009; BERNAT et al., 2013; PINELI et al., 2015; BERNAT et al., 2015; VANGA; RAGHAVAN, 2018; VIEIRA et al., 2019).

Poucas leguminosas, além da soja, são utilizadas para a elaboração de bebidas alternativas ao leite de vaca (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016). O grão-de-bico contém teor de proteína (24,6%) com alta biodisponibilidade e digestibilidade (48-89,01%). É a segunda leguminosa cultivada mais importante depois do feijão e representa 20% da produção mundial (FAO, 2018; SERRANO-SANDOVAL; GUARDADO-FÉLIX; GUTIÉRREZ-URIBE, 2019;

FARIDY et al., 2020). Ainda, o grão-de-bico possui baixa alergenicidade e apresenta compostos bioativos com atividade biológica antioxidante, anticancerígena, hipocolesterolêmica e antiinflamatória (CABANILLAS; JAPPE; NOVAK, 2018; FARIDY et al., 2020). Recentemente Rincon, Botelho e De Alencar (2020) demonstraram a possibilidade de utilização do grão-de-bico como alternativa para elaboração de bebida vegetal, os autores não avaliaram os efeitos do processo de fermentação da bebida por bactérias lácticas (BAL), porém ao associarem o grão-de-bico ao extrato de coco, melhoraram os aspectos nutricionais e sensoriais da bebida. O coco pode ser utilizado como uma forma natural de conferir aroma e sabor ao produto, além de incrementar as características nutricionais, pois o coco possui alto teor de gordura, antioxidantes e minerais como ferro, magnésio e zinco (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016).

O leite de vaca é uma importante fonte de proteína e amplamente consumido pela população (VANGA; RAGHAVAN, 2018). Devido a razões históricas, tecnológicas e nutricionais é o principal alimento utilizado na incorporação de bactérias lácticas. Uma vez que há o interesse crescente no desenvolvimento de bebidas não lácteas, outras matrizes são utilizadas para elaboração de novas bebidas e incorporação dessas bactérias, como bebidas à base de frutas e vegetais, e à base de cereais e oleaginosas (SHORI, 2016). No entanto, poucos estudos investigaram a possibilidade de elaboração de bebida fermentada a partir do grão-de-bico ou coco (WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018; MAURO; GARCIA, 2019; SKRZYPCZAK et al., 2019), nestes ambas as matrizes foram utilizadas de forma dissociada, portanto o presente estudo associa o grão-de-bico ao coco como alternativa de bebida fermentada.

A fermentação é um dos processos primitivos envolvidos na conservação de alimentos, que visa a utilização de micro-organismos benéficos, por meio de acidificação, resultando em alterações bioquímicas, como a glicólise, proteólise e lipólise, que agregam maior funcionalidade ao produto, devido ao aprimoramento das características nutricionais e de segurança do alimento, além dos aspectos sensoriais, decorrente de novos sabores e texturas (ASHAOLU, 2020).

Certas BAL potencialmente probióticas vêm sendo investigadas na atuação em processos de fermentação de bebidas (RATHORE; SALMERÓN; PANDIELLA, 2012; GIRI et al., 2018; MANTZOURANI et al., 2019). A estirpe *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81, por exemplo, é um potencial probiótico utilizado em processos de

fermentação e na elaboração de diferentes produtos, como leite fermentado, iogurte com polpa de yacon, bebidas vegetais de milho e sobremesas de chocolate (VALENCIA et al., 2016; PADILHA et al., 2017; MENEZES et al., 2018; VOGADO et al., 2018).

Probióticos são considerados micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Por secretarem vários metabolitos como ácidos graxos de cadeia curta, ácidos orgânicos e enzimas, e competirem com agentes patogênicos, os principais benefícios relatados pela ação dos probióticos são a regulação do trato gastrointestinal (TGI), a redução dos níveis séricos de colesterol, o aumento da imunidade e a atuação em alguns tipos de câncer, (PLAZA-DIAZ et al., 2019). Entretanto, para que tais benefícios ocorram é recomendado que o produto contenha no mínimo 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g ou mL (ŠERTOVIĆ et al., 2019). O alimento tem papel importante na viabilidade de bactérias probióticas, podendo atuar como matriz protetora diante das condições adversas do TGI, pois os probióticos para agirem em benefício, precisam ainda resistir ao baixo pH do suco gástrico e aos sais biliares (TERPOU et al., 2019).

No que se refere ao grão-de-bico e ao coco, pouco estudos investigam essas matrizes como opção para incorporação de BAL. Até o momento não há relatos da função protetora destes na sobrevivência de micro-organismos probióticos expostos às condições adversas do TGI. Diante dos possíveis benefícios do grão-de-bico na viabilidade de BAL e da possibilidade de utilização como bebida vegetal, associada ao extrato de coco como uma nova alternativa ao leite de vaca, investigar essa bebida com diferentes teores de açúcar mediante processo de fermentação por BAL torna-se crucial. Há escassez de estudos nessa área e maior funcionalidade pode ser agregada a bebida pela incorporação de potenciais probióticos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Elaborar bebidas de grão-de-bico e coco com diferentes teores de açúcar fermentadas por *Lactobacillus paracasei* LBC 81.

1.1.2. Objetivos específicos

- Analisar o crescimento de *Lactobacillus paracasei* LBC 81 em bebidas de grão-de-bico e coco elaboradas com diferentes teores de açúcar;
- Verificar a viabilidade do *Lactobacillus paracasei* LBC 81 em bebidas de grão-de-bico e coco elaborada com diferentes teores de açúcar ao longo do armazenamento refrigerado;
- Determinar as características físico-químicas das bebidas de grão-de-bico e coco após fermentação;
- Avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* LBC 81 na bebida de grão-de-bico e coco após exposição ao estresse gastrointestinal *in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Alimentos funcionais

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde. Alegações de que componentes alimentares podem oferecer benefícios para a população impulsionaram o interesse por alimentos funcionais (BAKSHI; CHHABRA; KAUR, 2020). Embora não haja um consenso universal, alimentos funcionais podem ser considerados como alimentos que possuem, além dos nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídios; componentes bioativos, cujo consumo pode resultar em um efeito benéfico específico (DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020).

O termo “alimento funcional” foi introduzido pela primeira vez no Japão em 1984, como resultado de investigações sobre as relações entre nutrição, satisfação sensorial e modulação de sistemas fisiológicos. Em 1991, o conceito de alimento funcional foi integrado ao sistema japonês FOSHU (Alimentos para Uso Específicos de Saúde, do inglês “*Foods for Specified Health Use*”). No entanto, foi o termo anterior que posteriormente difundiu-se pela Europa e Estados Unidos (BIGLIARDI; GALATI, 2013; DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020).

Para que um alimento seja designado como funcional são necessárias comprovações científicas do seu efeito benéfico e segurança para saúde. O consumo deve fazer parte da dieta usual, exercendo os potenciais benefícios, além da função primária de nutrição. Os alimentos funcionais atuam principalmente na prevenção de doenças relacionadas à nutrição humana e na melhoria do bem-estar físico e mental. As principais associações estão relacionadas à saúde cardiovascular e à saúde intestinal, ocorridas por meio de modificações no sistema imunológico. A funcionalidade desses é atribuída aos componentes bioativos (ARVANITTOYANNIS; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005).

Segundo Gul, Singh e Jabeen (2016), a partir do processo de produção dos alimentos funcionais, é possível dividi-los em categorias distintas como: alimentos básicos, em que contém naturalmente o componente bioativo; alimentos processados, no qual a adição de bioativos ocorre durante a produção; e alimentos aprimorados, em que o componente bioativo existe naturalmente, entretanto é modificado ou concentrado por engenharia genética ou de produção.

A legislação brasileira emprega dois conceitos relacionados aos alimentos funcionais, de alegação de propriedade funcional ou de alegação de saúde. O primeiro corresponde ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo. O segundo se refere a existência de relação do alimento ou ingrediente com específica doença ou condição relacionada à saúde (ANVISA, 1999). Conforme Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999, que regulamenta o registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, para tais alegações é necessário a apresentação de Relatório Técnico Científico com informações sobre o produto, como origem e recomendações de consumo, e alegações científicas conforme especificidade (ANVISA, 1999).

Alguns alimentos ou componentes listados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com alegação de propriedades funcionais e ou saúde são: ácidos graxos, como eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), que auxiliam positivamente na manutenção dos níveis normais de triglicerídeos; carotenoides como licopeno e luteína, com alegação de ação antioxidante, protegendo as células de danos oxidativos promovidos por radicais livres; fibras alimentares, que auxiliam no funcionamento intestinal; proteína de soja e fitoesteróis, que auxiliam na redução de colesterol; probióticos e prebióticos como a inulina e frutooligossacarídeos (FOS), que contribuem para o equilíbrio da microbiota (ANVISA, 2008).

Em específico, os probióticos possuem influência na saúde humana com ações positivas principalmente sobre o TGI, função imunológica e prevenção de câncer. O mercado de alimentos funcionais no Japão e na Europa é predominantemente de produtos probióticos, em função da imagem positiva dos probióticos entre os consumidores e das características intrínsecas dos produtos, normalmente armazenados em baixas temperaturas. Em países em desenvolvimento como o Brasil, a demanda por alimentos funcionais é crescente e os produtos lácteos probióticos são predominantes nesta categoria. Com a finalidade de desenvolver novos alimentos probióticos, com atribuições benéficas à saúde e propriedades organolépticas satisfatórias aos consumidores, crescentes pesquisas vêm sendo realizadas (BARCELLOS; LIONELLO, 2011; BIGLIARDI; GALATI, 2013).

2.2. Micro-organismos probióticos

A palavra probiótico é de origem grega e significa “para vida”. São micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). O termo foi utilizado pela primeira vez por Lilley e Stillwell, em 1965, inicialmente definindo extratos de tecidos capazes de contribuir para o equilíbrio microbiano intestinal. As estirpes mais utilizadas como probiótico são algumas BAL e leveduras (NOGUEIRA, GONÇALVES 2011; DOUILLARD; DE VOS, 2019; SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019).

As potenciais bactérias probióticas são geralmente isoladas de humanos, no entanto, outras fontes também são utilizadas como plantas, animais e o ambiente. Para o micro-organismo ser considerado probiótico, deve ser resistente as situações de estresse presentes no TGI do corpo humano, como pH ácido do suco gástrico e a presença de sais biliares no intestino. O micro-organismo também deve ser capaz de aderir ao epitélio intestinal e possuir atividade antimicrobiana. Ainda devem ser observadas as questões de segurança como resistência a antibióticos e ausência de efeitos adversos à saúde (SHOKRYAZDAN et al., 2017; ANVISA, 2018).

Uma estirpe probiótica é catalogada pelo gênero, espécie, subespécie, se houver, e uma identificação alfanumérica, como por exemplo *Lactobacillus casei* DN-114 001 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG. Os mais importantes gêneros de bactérias probióticas são *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (NOGUEIRA, GONÇALVES 2011; SHOKRYAZDAN et al., 2017; WGO, 2017).

Dentre os inúmeros benefícios alegados para os probióticos, Didari et al. (2014) mencionam que os probióticos são principalmente benéficos em doenças gastrointestinais, como síndrome do intestino irritável (SII), doença inflamatória intestinal (DII), diarreia causada por infecções e associada a antibióticos, enterocolite necrosante e pouchite. Também há relatos de benefícios dos probióticos no câncer de cólon, em doenças alérgicas como dermatite e rinite, e na redução dos níveis séricos de colesterol. Pela influência no metabolismo de carboidratos vêm sendo associados ao tratamento da obesidade (DIDARI et al. 2014; PLAZA-DIAZ et al., 2019).

É empreendido um grande esforço na definição dos critérios que comprovem tais efeitos dos organismos probióticos. A ANVISA assume dois tipos de alegações. A primeira, uma alegação geral, onde se exige pelo menos um estudo com nível de evidência adequado para a linhagem que comprove benefício, havendo mecanismos de ação bem estabelecidos. E a segunda, quando se pretende atribuir à linhagem uma alegação específica, são exigidos pelo menos dois estudos com nível de evidência adequado (ANVISA, 2017). Portanto os benefícios potenciais descritos só podem ser atribuídos às específicas estirpes analisadas em cada estudo e não podem ser generalizados para toda a espécie nem para todo o grupo BAL ou outros probióticos (WGO, 2017).

Apesar de existirem inúmeros estudos que demonstrem as evidências benéficas de potenciais estirpes probióticas, no Brasil, a ANVISA alega como probióticos somente: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei rhammnosus*, *Lactobacillus casei defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bifidum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animmalls*, *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2019).

Ainda não existe descrito de forma clara na literatura o mecanismo de ação dos probióticos para benefícios à saúde. Há relatos de que após a administração dos probióticos inicia-se o processo de colonização no TGI, no qual o organismo compete com bactérias patogênicas por sítios de ligação no intestino. Algumas *Bifidobacteriums*, e *Lactobacillus* podem produzir bacteriocinas que impedem a proliferação de patógenos específicos. Do mesmo modo, tem-se mencionado que metabolitos probióticos, como ácidos orgânicos, aminas e peróxido de hidrogênio, interagem com múltiplos alvos em algumas vias metabólicas que regulam a proliferação celular, diferenciação, apoptose, inflamação, angiogênese e metástase (PLAZA-DIAZ et al., 2019).

2.3. Probióticos em alimentos

O consumo de alimentos tradicionais e fermentados naturalmente, com culturas vivas potencialmente benéficas, ocorreu inconscientemente há milhares de anos (FIOCCO et al., 2020). Dentre os alimentos probióticos, o iogurte probiótico é o mais consumido pela população. Este, juntamente com outros alimentos como queijos, sobremesas, fórmulas

infantis e ingredientes probióticos devem atingir 50 bilhões de dólares em vendas até o final de 2020, com estimativa crescente de 8% ao ano (COLOMBO et al., 2018; MIN et al., 2018).

A expansão no mercado de alimentos probióticos está atribuída a características de micro-organismos vivos promotores de saúde. Elie Metchnikoff, em 1908, observou os primeiros benefícios relacionado ao leite fermentado. O próprio acreditava que camponeses búlgaros teriam maior longevidade, exclusivamente por consumirem grandes quantidades de leite fermentado, com alto número de *Lactobacillus*. Isto dificultaria o crescimento de bactérias patogênicas no TGI (ARYANA; OLSON, 2017). Desde então, outros benefícios vêm sendo associados aos alimentos probióticos (BEHERA; PANDA, 2020).

Durante muito tempo o setor de laticínios era o único a incluir alimentos probióticos. Os iogurtes com adição de probióticos, por exemplo, contribuem com quase 80% da produção global de produtos probióticos (BEHERA; PANDA, 2020). Com o aumento de alérgicos a proteína do leite, intolerantes à lactose e a adoção do veganismo entre outras questões relacionadas a saúde, alimentos não lácteos também são utilizados como fontes de bactérias probióticas (BEHERA; PANDA, 2020). Segundo Min et al. (2018), cereais, frutas, carnes e soja, são fontes de proteínas, minerais, vitaminas, fibras alimentares, antioxidantes e outros componentes bioativos, que podem ser utilizados para produção de alimentos probióticos não lácteos, garantindo a viabilidade dos micro-organismos benéficos. Assim diante dos fatores, os produtos probióticos alimentícios podem ser divididos em duas categorias distintas, conforme Tabela 1, classificados como lácteos e não lácteos (TERPOU et al., 2019).

Tabela 1. Principais alimentos probióticos lácteos e não lácteos.

Alimentos probióticos lácteos			
Alimentos	Exemplos	Estirpe probiótica	Referência
Queijos	Queijo cremoso	<i>L. paracasei</i> Lpc-37	Santini et al. (2012).
	Queijo minas frescal	<i>L. acidophilus</i> La-05	Felicio et al. (2016).
	Queijo prato	<i>L. casei</i> -01	Silva et al. (2018).
Iogurtes e leites fermentados	Iogurte suplementado com fibra de caqui e maçã	<i>L. acidophilus</i> La-5	Karaca, Saydam e Güven (2019).
	Iogurte adicionado de morango e sementes de chia	<i>Bifidobacterium lactis</i> B94	Kowalesk et al. (2020).
	Leite fermentado Yakult®	<i>L. casei</i> Shirota	Colombo et al. (2018).
Sorvetes	Sorvete de baunilha	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Ferraz et al. (2012)
	Sorvete de açaí	<i>L. rhamnosus</i> GG	Costa et al. (2017b).
Alimentos probióticos não lácteos			
Alimentos	Exemplos	Estirpe probiótica	Referência
Carnes	Salame probiótico	<i>L. plantarum</i> 299v	Blaiotta et al. (2018).
	Salsicha fermentada	<i>Enterococcus faecium</i> CRL 183	Roselino et al. (2020).
Sucos de frutas	Suco de maçã	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LC-01	Pimentel et al. (2015).
	Suco de cacau	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442	Filho et al. (2019).
	Suco de laranja	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	Sengün et al. (2020).
Extratos vegetais	Bebida de soja	<i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. animalis</i> Bb-12	Bedani et al. (2013).
	Bebida de aveia	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Bernat et al. (2013).
	Bebida de amêndoa	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Bernat et al. (2015).

A maior dificuldade na elaboração de alimentos probióticos está relacionada a viabilidade do micro-organismo. Para a obtenção dos efeitos terapêuticos é necessário haver níveis de contagem microbiana em toda vida útil do produto. Estudos relatam que 10^6 a 10^9 UFC por grama de alimento são aceitas como satisfatórias (NAZZARO et al., 2012; ŠERTOVIĆ et al., 2019). No entanto, não há um consenso universal, entre os países, do número de micro-organismos vivos existentes nos produtos que deve satisfazer os requisitos regulamentares. Nos Estados Unidos não há exigência regulatória específica. Na Austrália e na Nova Zelândia, é necessário um mínimo de 10^6 UFC por grama. Em contrapartida na Europa, a *European Food Safety Agency* exige um mínimo de 10^8 UFC por grama do produto (REZAC et al., 2018). No Brasil, atualmente, a RDC N° 241 estabelece os requisitos de segurança e benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Nesta não estão estabelecidos o número de contagem mínima dos micro-organismos probióticos, o que pode resultar em produtos com diversas concentrações de micro-organismos benéficos. Porém a estirpe utilizada deve ter comprovada a segurança e os benefícios por meio de apresentação de documentos técnicos ou estudos científicos (ANVISA, 2018).

A viabilidade microbiana pode ser afetada por uma série de fatores intrínsecos ao alimento como pH, acidez titulável, atividade de água e oxigênio, e extrínsecos relacionados ao processamento, como tratamento térmico, condições de refrigeração e estocagem. Com o propósito de favorecer a viabilidade microbiana, diferentes estratégias são aplicadas no desenvolvimento de novos produtos probióticos. A adição de compostos como açúcares, vitaminas, minerais, prebióticos, leite desnatado em pó e proteína do soro do leite, pode atuar como promotor do crescimento bacteriano ou protetor mediante processamento do alimento, isto por meio de ação crioprotetora, recobrimento da parede celular e redução da pressão osmótica em processos de liofilização. Outra estratégia utilizada é a microencapsulação, no qual as bactérias vivas são envoltas por um revestimento, que oferece proteção contra as condições desfavoráveis do ambiente (TERPOU et al., 2019).

Apesar do surgimento de processos para o aperfeiçoamento da viabilidade de bactérias probióticas, ainda são grandes os desafios no desenvolvimento de produtos alimentares dessa categoria. Estudar a relação entre os substratos alimentares e as bactérias benéficas é crucial para a elaboração de produtos alimentícios probióticos com maior sobrevivência (MIN et al., 2018).

2.3.1. Bactérias lácticas (BAL) e metabolismo fermentativo

As BAL são um grupo heterogêneo de bactérias, habitantes comuns de superfícies da mucosa humana, como cavidade oral, vagina e TGI. São caracterizadas como cocos ou bacilos, gram-positivas, catalase negativa, anaeróbias, não esporuladas, fastidiosas e aerotolerantes. Recebem o título de GRAS (Geralmente reconhecidas como seguras, do inglês “*Generally Recognised As Safe*”). Utilizam como fonte de substrato carboidratos, tendo como principal produto final da fermentação o ácido láctico. Filogeneticamente, apenas bactérias da ordem *Lactobacillales* são consideradas BAL: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, e *Streptococcus*. Entretanto por apresentarem características fisiológicas semelhantes, *Bifidobacterium* e alguns *Bacillus* também são mencionados como BAL (SAUER et al., 2017).

Por meio do metabolismo fermentativo da glicose, as BAL podem ser classificadas em três grupos, homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas. As homofermentativas convertem os carboidratos, principalmente a glicose, em duas moléculas de lactato por molécula de glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). As heterofermentativas, além do lactato, podem liberar outros compostos, como, ácido acético, etanol e CO₂ pela via das pentoses. Já as bactérias heterofermentativas facultativas, na presença de glicose, as enzimas da via fosfogluconato permanecem inibidas. No entanto em condições de limitação de fontes de carbono, tais enzimas participam do metabolismo fermentativo, podendo produzir ácido acético, etanol e CO₂; assim realizam ambos processos fermentativos (GARCÍA; RENDUELES; DÍAZ, 2019; SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019). O metabolismo homofermentativo e o heterofermentativo, a partir da glicose como substrato, estão demonstrados na Figura 1. Os produtos finais da fermentação encontram-se destacados.

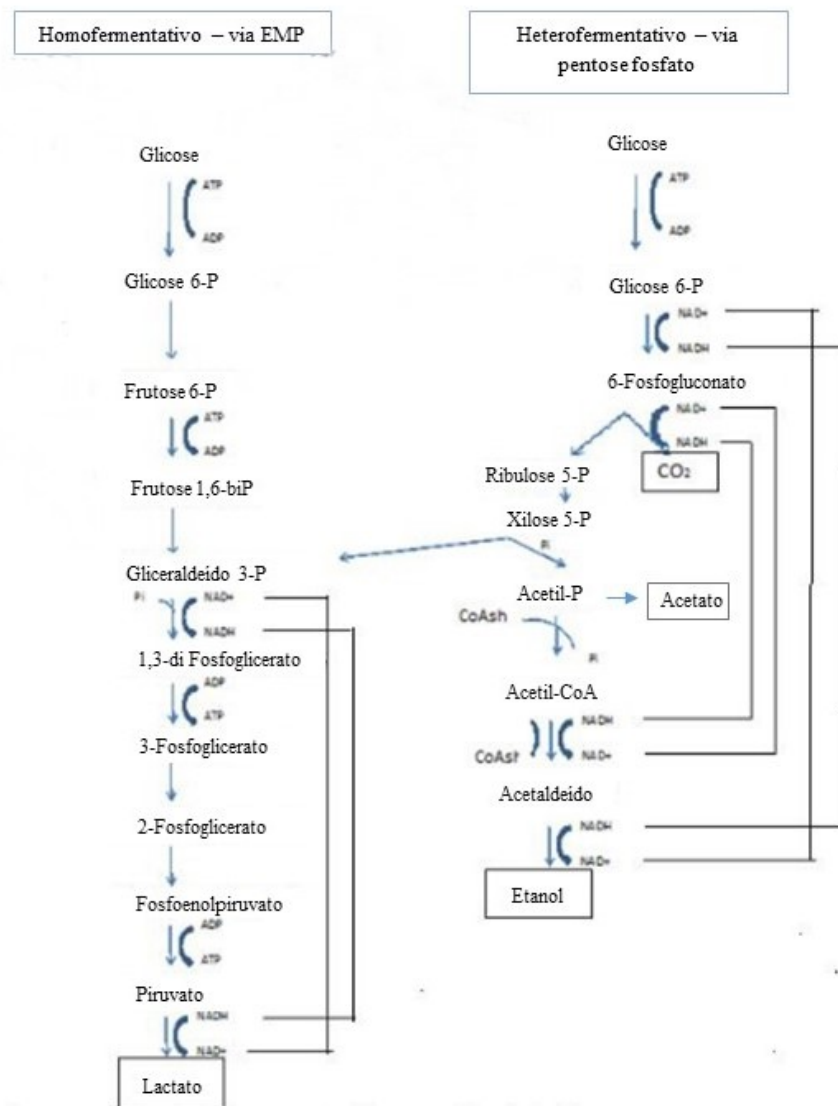


Figura 1. Vias metabólicas das bactérias lácticas (BAL), processos homogêneo e heterofermentativo a partir da degradação da glicose. Fonte adaptada de Bintsis (2018).

Além do metabolismo de carboidratos, as BAL também podem hidrolisar proteínas e lipídeos. Estes são os principais processos para o desenvolvimento do sabor em produtos fermentados. A atividade proteolítica das BAL pode variar conforme a estirpe. A degradação das proteínas em peptídeos e aminoácidos livres é catalisada por enzimas proteolíticas presentes nas bactérias, e este é o principal fator que influencia o sabor e a textura de diferentes tipos de queijos. Já o metabolismo lipídico ocorre de forma limitada, na degradação podem ser liberados certos ácidos graxos livres, que são compostos aromatizantes essenciais para alguns queijos (BINTSIS, 2018).

Comumente as BAL são utilizadas como culturas iniciadoras da fermentação de alimentos, justamente devido a sua contribuição para o desenvolvimento de sabor, aroma, e retardo da deterioração, através da produção de compostos com ação antimicrobiana e realçadores de sabor e textura, como ácidos orgânicos, bacteriocinas, exopolissacarídeos e várias enzimas, resultantes do processo fermentativo (SIDOOSKI et al., 2018; GAO et al., 2019; SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019).

Dentre vários gêneros de BAL, o gênero *Lactobacillus* é o mais estudado e utilizado na produção de alimentos. Isto se justifica pela sua longa história de utilização na produção de alimentos de origem animal e vegetal, com amplas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica. Possui inúmeros efeitos benéficos descritos na literatura, estando entre os probióticos mais utilizados (SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019).

2.3.1.1. *Lactobacillus paracasei*

O *Lactobacillus paracasei* é uma BAL, tipicamente usada na indústria de laticínios para produzir queijo, iogurte e outros produtos lácteos fermentados. Por sobreviver ao baixo pH e a exposição a sais biliares, produzir bacteriocinas e possuir atividade proteolítica, é considerado um micro-organismo de desempenho funcional, utilizado no desenvolvimento de novos produtos probióticos (CHIANG; PAN, 2012; DI CERBO; PALMIERI, 2013).

Os polissacarídeos extracelulares (PSE) são compostos produzidos pela espécie *Lactobacillus paracasei*, com importante papel na proteção bacteriana. Estão fortemente associados à superfície da célula formando uma cápsula, ou fracamente ligados às estruturas celulares externas, ou são secretados. É a camada de PSE que está relacionada a proteção contra condições ambientais adversas do TGI, fazendo com que o micro-organismo se mantenha no intestino humano, formando barreiras contra patógenos e atenuando processos inflamatórios. Além disso, os PSE produzidos pelos *Lactobacillus* também podem ser utilizados como aditivos na indústria alimentícia para melhorar a viscosidade e aprimorar as propriedades tecnológicas de produtos (BENGOA et al., 2018; BENGOA et al., 2019a).

Alguns estudos vêm investigando os benefícios do *Lactobacillus paracasei* em processos inflamatórios. Um ensaio clínico realizado por Nocerino et al. (2017), constatou que o leite desnatado fermentado com a estirpe *Lactobacillus paracasei* CBA L74 pode prevenir doenças infecciosas comuns, como infecções respiratórias e do TGI, em crianças de

12 a 48 meses, devido a atividade imunorreguladora exercida pelo probiótico. Roggero et al. (2020) em ensaio clínico, demonstram que bebês recém-nascidos, alimentados com fórmula fermentada por *Lactobacillus paracasei* CBA L74, se aproximaram da imunidade adquirida (IgAS - imunoglobulina A secretora) de bebês amamentados, segundo os pesquisadores, tal fato diminuiria as chances de infecções em bebês alimentados por fórmulas infantis. Outro estudo realizado por Lee et al. (2017) relata que o consumo regular de iogurte com *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* e *Lactobacillus plantarum* é uma opção eficaz para melhorar a função imunológica, aumentando a função das células *natural killers* (NK) e a concentração de *interferon gama* (IFN- γ).

Outros benefícios também são atribuídos ao uso de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*. Chiang e Pan, (2012), em revisão, mencionam achados de que a estirpe *L. paracasei subsp. paracasei* NTU 101 possui atividade antiaterosclerótica por aumentar a capacidade antioxidante total. Os autores ainda relatam que em ratos com hipertensão, o leite fermentado com a estirpe NUT 101 reduziu a pressão arterial, por aumentar o conteúdo de peptídeos bioativos ou isoflavonas agliconas, inibindo a enzima conversora de angiotensina (CHIANG; PAN, 2012).

Por apresentar relatos benéficos, estudos vêm investigando novas potenciais estirpes probióticas do gênero *Lactobacillus paracasei*, que podem ser isoladas de diferentes matrizes, como por exemplo Bengoa et al. (2019b), que isolaram a partir de grãos de Kefir, três diferentes estirpes de *Lactobacillus paracasei* CIDCA8339, CIDCA83123 e CIDCA83124. Todas durante o processo fermentativo produziram metabolitos potencialmente bioativos, como ácidos orgânicos e exopolissacarídeos. Outro estudo desenvolvido por Reale et al. (2015) investigou diferentes estirpes de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. casei*, isoladas de laticínios e derivados, bebidas, vegetais e da microbiota humana. No total 13 estirpes mostraram-se mais tolerantes a alta acidez, sais biliares e cloreto de sódio. Esses mesmos estudos sugerem ainda que essas potenciais estirpes probióticas podem ter uma promissora aplicação na elaboração de novos produtos funcionais (REALE et al., 2015; BENGGOA et al., 2019b).

2.3.2. Bebidas fermentadas probióticas

O iogurte e os leites fermentados são utilizados há muito tempo como alimentos probióticos, isto devido a rica composição da matriz láctea que apresenta componentes favoráveis para crescimento de micro-organismos (SHORI, 2016). Uma das primeiras bebidas fermentadas comerciais existentes é o Yakult®, que contém a estirpe *Lactobacillus casei Shirota*. Posteriormente, outras bebidas fermentadas lácteas com outras estipes probióticas foram desenvolvidas (TURKMEN; AKAL; ÖZER, 2019). Entretanto com a necessidade de implementação e diversificação de produtos, os fabricantes de alimentos começaram a formular alimentos probióticos não lácteos com espécies selecionadas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GAWKOWSKI; CHIKINDAS, 2013).

Dentre as bebidas probióticas fermentadas não lácteos existentes têm-se o Kombucha, que é uma bebida fermentada feita a partir de chá adoçado, e outros como fermentados de bebidas à base de cereais e fermentados de sucos de frutas comercialmente disponíveis nos Estados Unidos da América (GAWKOWSKI; CHIKINDAS, 2013; REZAC et al., 2018). No Brasil, apesar de já existirem bebidas probióticas não lácteas, como o Kombucha, os principais produtos probióticos alimentícios fermentados comercializados ainda são os leites fermentados, leites fermentados aromatizados e iogurtes (COLOMBO et al., 2018).

Alguns estudos investigam o desenvolvimento de bebidas não lácteos e a viabilidade de potenciais micro-organismos probióticos, como por exemplo um estudo realizado por Filho et al. (2019) que avaliou a viabilidade da estirpe *Lactobacillus casei* NRRL B-442 no período de estocagem do suco de cacau adicionado de sacarose e sucralose. O suco contendo sacarose apresentou viabilidade de cerca de 9 log UFC/ml até 21 dias de armazenamento e o suco contendo sucralose manteve a viabilidade de cerca de 7 log UFC/mL até 42 dias de armazenamento. Outro estudo realizado por Rodrigues et al. (2017) investigou o impacto da mesma estirpe na fermentação de bebida de cupuaçu. Após 18 h de fermentação em temperatura de 30 °C, a viabilidade microbiana foi maior que 9 log UFC/mL. Ainda outra pesquisa realizada por Menezes et al. (2018) avaliaram a estabilidade da estirpe *Lactobacillus paracasei* LBC 81 juntamente com co-culturas de leveduras em bebida de milho. A dinâmica de estabilidade do LBC 81 foi semelhante quando inoculada em uma única cultura ou associado as estirpes de leveduras, apresentando após 24h de fermentação em temperatura de 37 °C viabilidade de cerca de 7 log UFC/mL.

Apesar dos desafios encontrados na elaboração de novas bebidas probióticas, as vantagens de se produzir bebidas fermentadas incluem os novos e desejáveis sabores e texturas que são completamente diferentes daqueles presentes no produto de partida. É durante o processo fermentativo que a atividade enzimática da matéria-prima e a atividade metabólica dos micro-organismos podem alterar as propriedades nutritivas e bioativas das matrizes alimentares, trazendo benefícios para a saúde humana. A fermentação pode resultar na desfosforilação de fitato, componente presente na maioria das leguminosas, melhorando a biodisponibilidade de nutrientes dietéticos essenciais (MARCO et al., 2016; AMRITHA; VENKATESWARAN, 2017). Os metabólitos produzidos pelas bactérias probióticas diminuem o pH do alimento fermentado, afetando negativamente as bactérias patogênicas, o que aumenta a segurança e a estabilidade dos produtos fermentados lácteos e não lácteos (GAWKOWSKI; CHIKINDAS, 2013).

2.3.3. Viabilidade de probióticos incorporados em diferentes matrizes alimentares após exposição às condições gastrointestinais simuladas

O processo de digestão em um indivíduo saudável inicia-se com o contato do alimento na cavidade oral, onde é misturado com saliva, contendo enzimas como a ptialina (amilase salivar) que inicia a hidrólise do amido e a lisozima com atividade antimicrobiana. Após a deglutição e a passagem pelo esôfago, o bolo alimentar chega ao estômago. Encontra no estômago um ambiente ácido devido ao suco gástrico de pH em torno de 2,0, onde são secretadas as enzimas pepsina e lipase para a quebra das moléculas de proteínas e lipídeos. O quimo permanece por cerca de 2 a 4 horas, a depender da refeição ser líquida ou sólida, no estômago e, passa para o intestino delgado, com pH em torno de 8,0, próximo da neutralidade. Nessa região são secretadas as enzimas pancreáticas e sais biliares para hidrólise de moléculas de carboidratos, proteínas e lipídeos. O processo pelo intestino delgado leva cerca de 4 horas. Chegando ao cólon, os componentes residuais dos alimentos que não foram digeridos são utilizados pela microbiota humana (HUANG; ADAMS, 2004).

Para que as bactérias probióticas exerçam efeitos benéficos sobre a microflora intestinal do hospedeiro, devem ser capazes de resistir as condições do TGI. As bactérias probióticas precisam ser resistentes principalmente a alta acidez do estômago e, por afetar os fosfolipídios e proteína da membrana bacteriana, também precisam ser resistentes aos sais biliares no intestino. Para isso, são investigadas diferentes matrizes que mantenham as

bactérias viáveis durante todo o prazo de validade do produto e possibilitem que durante a passagem pelo TGI os micro-organismos cheguem em número suficiente para produzir benefícios (NAZZARO et al., 2012).

Em produtos lácteos como no estudo realizado por Diniz-Silva et al. (2019), que investigou a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* LA-05 em queijo minas frescal adicionado de óleo de orégano e alecrim, utilizados como agentes conservantes do queijo, a bactéria probiótica LA-05 se manteve viável durante armazenamento refrigerado por 21 dias, apresentando valores de 6 a 7 log UFC/g após processo de digestão *in vitro*. Os agentes conservantes, por apresentarem componentes antimicrobianos, interferiram negativamente na viabilidade bacteriana. No entanto, os nutrientes e a alta atividade de água presente no queijo foram suficientes para favorecer a viabilidade do probiótico.

Outra pesquisa desenvolvida por Vogado et al. (2018) avaliou os efeitos de diferentes concentrações de polpa de banana verde sobre a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 em leite fermentado, submetidos a condições de estresse ácido e estresse na presença de sais biliares. A adição de 3% de polpa de banana verde forneceu efeito protetor na sobrevivência da estirpe, com resultados de 7 a 8 log UFC/mL, devido a presença de amido resistente, compostos fenólicos, minerais e vitaminas contidos na polpa. No entanto, menor sobrevivência do micro-organismo foi observada, quando 6% e 9% de polpa de banana verde foi adicionada ao leite. Os autores justificaram que o crescimento acelerado da bactéria no processo de fermentação, possivelmente desativou mecanismos de proteção, tornando a estirpe mais sensível diante da exposição as condições de estresse.

Buriti, Castro e Saad (2010) investigaram a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La-05 em mousse de goiaba com substituição da gordura do leite por inulina e concentrado proteico de soro do leite, para manter as características de viscosidade do produto. Nas simuladas condições gástricas, a substituição de gordura por inulina se mostrou mais favorável até o sétimo dia de armazenamento, devido ao efeito protetor da inulina como agente prebiótico, melhorando a sobrevivência do *L. acidophilus* com resultado de 4 log UFC/g ao final do processo entérico. Porém, posteriormente ao armazenamento do mousse de goiaba a 4 °C por 14 dias, a sobrevivência probiótica durante os ensaios foi reduzida consideravelmente, com resultado de cerca de 2 log UFC/g do produto. Isto porque, a temperatura de armazenamento não foi favorável para que o micro-organismo utilizasse a

inulina como substrato, ocorrendo sucessivas reduções de viabilidade ao longo da estocagem, o que afetou negativamente a sobrevivência após digestão *in vitro*.

Costa et al. (2017b) observaram a sobrevivência do *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporado ao sorvete de açaí armazenado a -18°C por 122 dias. No final da digestão *in vitro*, as formulações testadas apresentaram média de 4,30 log UFC/g do produto, resultando em um maior valor quando comparado ao controle (cultura na forma ativa), com 2,86 log UFC/g. Os autores concluíram que o sorvete de açaí se mostrou como matriz protetora para o *L. rhamnosus* GG diante do teste de resistência, isto devido aos componentes presentes no açaí como polifenóis e a outros ingredientes contidos no sorvete como frutooligossacarídeos (FOS), favorecendo a viabilidade do micro-organismo.

Succi et al. (2017) analisaram a sobrevivência de diferentes estirpes probióticas liofilizadas após condições gastrointestinais simuladas, em chocolate amargo com 80% de cacau e alto teor de fenóis. As estirpes adicionadas ao chocolate (*L. rhamnosus* GG e *Lb. paracasei* F19) apresentaram contagem inicial de cerca de 8 log UFC/g e sofreram redução de 4 ciclos logaritmos na fase gástrica. Quando expostos à solução eletrolítica simulando as condições intestinais, ambas as estirpes mostraram uma recuperação de vitalidade de cerca de 1 ciclo logaritmo. Os autores concluíram que o chocolate amargo, por conter compostos antioxidantes, pode servir como agente protetor dos micro-organismos probióticos durante o processo de estresse gastrointestinal.

Já em produtos não lácteos, Furtado et al. (2019) conduziram uma pesquisa que investigou a sobrevivência diante de condições gastrointestinais simuladas do *Lactobacillus acidophilus* La-05, *Lactobacillus plantarum* LP299v e *Lactobacillus rhamnosus* GG adicionados em suco de manga. No teste de resistência no 28º dia de armazenamento refrigerado, as estirpes *L. rhamnosus* GG e *L. plantarum* LP299V permaneceram com 6,76 e 6,09 log UFC/mL, respectivamente, mostrando que o suco de manga foi uma potencial matriz protetora para essas estirpes. Os pesquisadores justificaram que as alterações de pH durante o armazenamento das bebidas tornaram as estirpes resistentes ao teste de tolerância. Fato contrário foi observado no suco contendo *L. acidophilus* La-05, no qual não houve grandes alterações de pH no meio durante o armazenamento da bebida. Quando submetido ao teste a sobrevivência, a bactéria permaneceu com cerca de 1 log UFC/mL.

Valero-Cases e Frutos (2017) observaram a sobrevivência do *Lactobacillus plantarum* CECT 220 em sucos fermentados de cenoura e laranja adicionados de 0, 1 e 2% de inulina.

Em todas as formulações, o CECT 220 permaneceu viável após digestão *in vitro*, o suco adicionado de 2% de inulina no 30º dia de armazenamento apresentou maior sobrevivência da estirpe com 7,40 log UFC/mL. Esse comportamento ocorreu devido a refrigeração e às condições intestinais simuladas, que limitaram o consumo de alguns açúcares disponíveis no suco, favorecendo a utilização da inulina como substrato para o CECT, o que influenciou positivamente na sua sobrevivência. Assim os pesquisadores concluíram que o suco de cenoura e laranja pode ser uma matriz protetora para o micro-organismo probiótico e, tal efeito pode ser potencializado com a adição da inulina.

Extratos vegetais também podem ser substratos para crescimento e sobrevivência de probióticos. Albuquerque et al. (2019) avaliaram a sobrevivência após condições gastrointestinais simuladas das estirpes *Streptococcus thermophilus* TH-4 e *Lactobacillus rhamnosus* LGG no extrato fermentado de soja enriquecido com subproduto de maracujá e FOS. Embora durante a digestão simulada não foram observados efeitos protetores do subproduto de maracujá e FOS, o extrato de soja proporcionou a sobrevivência da estirpe *L. rhamnosus* LGG, partindo de uma contagem inicial de cerca 8 log UFC/mL, apresentando após ensaio reduções entre 0,6 log a 4,58 log UFC/mL. Resultado semelhante foi obtido em um outro estudo realizado por Bedani, Rossi e Saad (2013) que investigou a sobrevivência *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 também em um produto de soja fermentado, enriquecido de inulina e farinha de okara, subproduto do extrato de soja com propriedades antioxidantes e efeito prebiótico. O efeito protetor esperado da inulina e da farinha de okara não foi significativo, porém diante das condições gastrointestinais simuladas, a bebida de soja isoladamente, sem adição de farinha de okara e inulina, melhorou a sobrevivência do Bb-12 com populações médias de 8 a 9 log UFC/g durante o armazenamento, sendo considerada pelos pesquisadores boa matriz na proteção dos probióticos contra as condições adversas do TGI.

De fato a sobrevivência de micro-organismos probióticos é fortemente influenciada pela matriz alimentar (ALBUQUERQUE et al., 2019). Porém são poucos os estudos que utilizam extratos vegetais, como a bebida de soja, como matriz para avaliar a sobrevivência de bactérias probióticas após condições gastrointestinais simuladas. Assim sugere-se que mais estudos sejam realizados, para investigar tais tipos de matrizes como veículos para a sobrevivência de micro-organismos benéficos.

2.4. Extratos vegetais

Extratos vegetais ou bebida à base de plantas são comumente utilizados como alternativas ao leite de vaca. Resultam da extração de material vegetal em água, com aparência e consistência semelhante ao leite. Embora não haja uma classificação clara dessas alternativas, podem ser divididas em 5 categorias: extratos à base de cereais como arroz, milho e aveia; à base de leguminosas como soja, amendoim e caupi; extrato de nozes como amêndoa, avelã e coco; à base de sementes como gergelim, girassol e linhaça e à base de pseudocereais como quinoa e amaranto (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016).

O consumo de bebidas vegetais ocorre há anos como parte tradicional de várias culturas, com grande variedade em diferentes regiões do mundo. A bebida de soja foi um dos primeiros extratos a ser utilizada pela população para fornecer nutrientes e substituir o leite de vaca, sendo atualmente o substituto mais comum. Os principais consumidores desse produto são indivíduos com intolerância à lactose e alergia ao leite de vaca. No entanto, 14% dos indivíduos que sofrem de alergia ao leite de vaca também têm reações adversas a soja (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2018).

O extrato de amêndoa é uma alternativa como substituto do leite de vaca. Possui propriedades nutricionais como o alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, é fonte de vitamina E e minerais como cálcio, magnésio, selênio, potássio, zinco, fósforo e cobre. É nutricionalmente melhor quando comparado a outras bebidas vegetais, no entanto a alta prevalência de alergia a nozes, no qual nos Estados Unidos chega a ser a terceira mais comum relatada, limita a utilização da bebida (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016; BAKER; KATTAN, 2018; IORIO et al. 2019).

Outro substituto do leite é a bebida à base de aveia, que apresenta benefícios terapêuticos por conter fibras alimentares e fitoquímicos. Possui proteína e cálcio, além de apresentar uma fração altamente viscosa de beta-glucana que está associada a diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016; ANGELOV; YANEVA-MARINOVA; GOTCHEVA, 2018). Porém apresenta em sua composição o glúten, principal fração proteica associada a doença celíaca (DC), o que restringe a utilização da bebida por indivíduos com DC (SCALIN, 2010, *apud* SOLORZANO, 2013).

Fatores como as alergias, as intolerâncias ou estilos de vida diferenciados impulsionaram o mercado europeu que em 2015 apresentou mais de 130 diferentes bebidas

vegetais com valor total de faturamento de 1,5 bilhão de dólares (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2018). Outro fator para a expansão do mercado de bebidas vegetais é a preocupação com a sustentabilidade. Os alimentos de origem vegetal são mais sustentáveis do ponto de vista ambiental. Os produtos à base de carne possuem o maior impacto seguido pelos produtos lácteos. Para a produção de proteína animal é exigida cerca de 100 vezes mais água do que a produção da mesma quantidade de proteínas baseadas em plantas. Assim os produtos de origem vegetal também podem servir como fonte de proteína na dieta (ALSAFFAR, 2016; JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017). Um estudo realizado por Seves et al. (2017) investigaram o impacto de dietas com pouco ou nenhum consumo de carne e laticínios. Os autores relataram que a partir de uma substituição de 30% desses alimentos, pode-se reduzir o impacto ambiental em 14% sem comprometer a adequação nutricional da dieta.

Quando as bebidas vegetais são avaliadas nutricionalmente, apenas a bebida de soja fornece quantidades de proteínas compatíveis às quantidades do leite de vaca (3,28 g/100 mL). O extrato de amêndoa fornece quantidade limitada de proteína, sendo 1,67 g/100 mL (VANGA; RAGHAVAN, 2018). Pineli et al. (2015) desenvolveram uma bebida à base de quinoa que apresentou teor de proteína de 1,72 g /100 mL, inferior ao leite de vaca. Faccin et al. (2009) elaboraram uma bebida tendo como fonte primária o arroz orgânico, que apresentou quantidade proteica de 1,15g/100 mL, também inferior as quantidades contidas no leite de vaca.

Um estudo realizado por Jeske; Zannini; Arendt (2017) investigou as propriedades físico-químicas e nutricionais de 17 diferentes extratos de vegetais à base de cereais, nozes e leguminosas. Metade das amostras, quando comparadas ao leite de vaca, apresentaram baixo ou nenhum conteúdo proteico, com exceção da bebida de soja com 3,7% de proteína. Os valores de índice glicêmico das bebidas variaram de 45 a 100. Os autores relataram que a maioria das bebidas era instável com separação de até 54,39%/h e grau de branura inferiores ao leite de vaca, e concluíram que as propriedades nutricionais e físico-químicas são totalmente dependentes da fonte e do processamento realizado durante a elaboração das bebidas. Sethi; Tyagi; Anurag (2016) mencionam que os extratos vegetais são diferentes quanto aos aspectos nutricionais e, para se obter um produto com valor nutricional semelhante ao leite de vaca são misturadas duas ou mais bebidas vegetais e também são realizadas fortificações com proteínas, vitaminas e minerais.

As bebidas vegetais são uma importante área de pesquisa, devido ao aumento de consumidores específicos que representam uma enorme expansão para o mercado de alimentos. São necessárias investigações de processamentos, fortificações, e intervenções tecnológicas para o desenvolvimento de bebidas nutricionalmente completas e com boas características sensoriais (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016). Rincon, Botelho e De Alencar (2020) investigaram o grão-de-bico, devido ao seu teor protéico, juntamente com o coco, em razão do seu teor lipídico e aroma característico, como possíveis componentes para a elaboração de extrato vegetal. Os pesquisadores desenvolveram formulações com boa composição nutricional, quando comparadas ao leite de vaca e outros substitutos do leite, e mediante análise sensorial obtiveram aceitação para as formulações com 90 e 70% extrato de grão-de-bico. Por tanto, este seria um novo potencial extrato vegetal, utilizado como alternativa ao leite.

2.5. Grão-de-bico

O grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) é uma planta derivada da família Fabaceae. É cultivado principalmente na Ásia, Europa, Austrália e América do Norte, regiões de clima temperado e terras semiáridas. Existem duas variedades de grão-de-bico, *Kabuli* e *Desi*. Os grãos da espécie *Desi* são escuros e têm superfície enrugada, esta variedade é cultivada principalmente em terras semiáridas. Já os grãos da espécie *Kabuli* são ligeiramente maiores, com uma cobertura fina e brilhante, e são cultivados em climas temperados (RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015).

Dentre as leguminosas existentes, o grão-de-bico é a terceira mais importante representando 20% da produção mundial, com cerca de 9 milhões de toneladas por ano. Um dos maiores produtores de grão-de-bico é a Índia, que fornece aproximadamente 60% da produção global, seguida da Turquia, Paquistão e Irã com contribuições de 7,6%, 7% e 3,5%, respectivamente. Entretanto a produção brasileira ainda é pequena e por isso, não existem registros nas estatísticas nacionais, havendo a necessidade de importação de quantidades crescentes (EMBRAPA, 1998; RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015; FAO, 2018).

O grão-de-bico é uma das principais fontes proteicas vegetais. Um estudo realizado por Margier et al. (2018), caracterizou a composição nutricional e compostos bioativos de

cinco leguminosas, dentre essas o grão-de-bico que apresentou 7,82g de proteína em 100 g do produto cozido. A Tabela 2 descreve a composição nutricional do grão-de-bico.

Tabela 2. Composição nutricional do grão-de-bico por 100 g do produto cozido

Nutrientes	Quantidades
Carboidratos (g) *	50 – 70
Proteínas (g)	7,82
AA essenciais (g)	3,45
AA não essenciais (g)	4,37
Lipídeos totais (g)	2,04
Fibras totais (g)	8,20
Minerais (mg)	
Cálcio	72,00
Ferro	1,30
Magnésio	44,00
Manganês	0,86
Fósforo	140,00
Zinco	1,10
Compostos bioativos (mg)	
Saponinas	121,86
Polifenóis totais	24,98

AA: aminoácidos. * Hall, Hillen e Robinson, (2017). Fonte: adaptada de Margier et al. (2018).

As principais proteínas encontradas nas leguminosas, portanto no grão-de-bico, são a albumina e a globulina e em pequena quantidade a gluteína e a prolamina (RACHWA-

ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015). Porém o conteúdo proteico do grão-de-bico pode variar conforme espécies e ainda é fortemente influenciado pelas condições ambientais e pelas práticas agronômicas, que podem também alterar a sua qualidade nutricional (AKBABA; ŞAHIN; TÜRKEZ, 2012). Um estudo realizado por Erba et al. (2019) relatou o aumento de quase 10% da proteína contida no grão-de-bico, após processo de germinação. Outro estudo realizado por Wang et al. (2009b) constatou aumento de 3% e 6% da proteína bruta presente no grão-de-bico tipo *Desi* e *Kabuli*, após realizar o cozimento.

Quando são observados os aminoácidos essenciais e não essenciais existentes no grão, estes estão presentes na mesma proporção. Dentre os aminoácidos essenciais, o grão-de-bico contém triptofano (1,1%), um precursor da serotonina, substância responsável pela sensação de bem-estar; e também é fonte de metionina (1,6%) e cisteína (1,3%) (HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017; FRIEDMAN, 2018). Já em relação aos lipídeos totais, o grão-de-bico cozido apresenta maior teor lipídico quando comparado a outras leguminosas, isto deve-se ao fato do conteúdo de esterol e fosfolípidios serem de 4 a 10 vezes mais elevados no grão-de-bico do que em outras leguminosas. Além disso a maior parte dos ácidos graxos presentes no grão-de-bico são insaturados, contendo principalmente ácido linoleico, ácido oleico e ácido linolênico. O ácido α -linolênico é um ácido essencial importantes para o crescimento, funções fisiológicas e manutenção do organismo (ZIA-UL-HAQ et al., 2007; MARGIER et al., 2018).

Em relação aos carboidratos totais, o grão-de-bico contém de 50 - 70 g/100 g. O amido é o principal carboidrato disponível (35% resistente e 65% disponível) entre os monossacarídeos estão a ribose, frutose e glicose, e entre os oligossacarídeos estão rafinose, estaquiase e verbarose (RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015; HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017; FARIDY et al. 2020). Além disso, o grão é uma excelente fonte de fibras solúveis e insolúveis contendo um total de 8,20 g /100 g. Segundo Wang et al. (2009b), as leguminosas devido ao seu teor de fibras podem trazer inúmeros benefícios como aumento da saciedade e atuação na prevenção contra doenças cardiovasculares. Ainda o grão-de-bico é uma boa fonte de cálcio, magnésio, fósforo, ferro, zinco e manganês. Os teores de manganês, zinco e fósforo são mais altos quando comparados a outras leguminosas (RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015). O grão também apresenta quantidades de compostos bioativos como as saponinas 121,86 mg/100 g e polifenóis totais 24,98 mg/100g descritos na tabela 2, no qual possuem propriedades antioxidantes (LIGOR et al., 2018).

O grão-de-bico é utilizado de várias formas. Normalmente é consumido cozido, sendo um bom complemento para saladas especialmente populares na Europa Ocidental e nos EUA, enquanto que no Oriente Médio é consumido com açúcar ou especiarias. Entre as aplicabilidades do grão-de-bico, a maior está associada a elaboração de pães e massas (RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015). Há pouco tempo, tem-se estudado a possibilidade de utilização do grão na fermentação por BAL em produtos lácteos (ZARE et al., 2012). As leguminosas de forma geral, devido aos componentes de sua composição como carboidratos complexos (fibras, amido resistente e oligossacarídeos), proteínas, vitaminas, minerais e antioxidantes, podem contribuir para o crescimento de bactérias probióticas (ZARE et al., 2012).

Chen et al. (2018) observaram que a adição farinha de grão-de-bico em iogurtes em quantidade de 1 % a 5 %, aumentou a taxa de fermentação das culturas *starters*, diminuindo o tempo de processamento do iogurte, e ainda proporcionou maiores contagens de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* durante o armazenamento dos produtos a 4 °C por 21 dias, quando comparados ao iogurte controle, sem adição de farinha de grão-de-bico. Os pesquisadores mencionaram que a rafinose, presente no grão, pode ter promovido a maior atividade metabólica das BAL.

Outro estudo realizado por Hussein et al. (2020) demonstrou que a adição de 3% de farinha de grão-de-bico em iogurte, resultou em maior viabilidade da cultura mista probiótica de *B. animalis subsp. lactis* e *L. acidophilus*, no início da estocagem do produto, com contagem de 8,68 log UFC/g. Ainda, as amostras adicionadas de 1 %, 2 % e 3 % farinha de grão-de-bico, se destacaram durante período de armazenamento a 4 °C por 21 dias, com viabilidade das culturas probióticas superiores a encontrada para o iogurte controle, sem adição da farinha do grão. Segundo os autores, isto se deve aos oligossacarídeos e compostos fenólicos, presentes no grão-de-bico, que atuariam como fonte de energia suplementar para o crescimento microbiano.

A utilização de farinha de grão-de-grão de bico em iogurtes é uma alternativa para melhorar as características nutricionais, com influencia positiva na viabilidade de probióticos (CHEN et al., 2018; HUSSEIN et al., 2020). Entretanto, pouco se sabe sobre a utilização do extrato de grão-de-bico, como principal produto para a fermentação de bactérias. Fu e Zhang (2012) avaliaram uma bebida, composta por extrato de grão-de-bico e leite reconstituído (1:1 v/v), fermentada por cultura mista de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Após processo de

fermentação, obtiveram considerável contagem bacteriana, de $2,4 \times 10^9$ UFC/mL. Wang, Chelikani e Serventi (2018), analisaram bebida de grão-de-bico fermentada por cultura mista de BAL (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*). Após processo de fermentação, obtiveram contagem bacteriana aceitável, de $7,4 \times 10^6$, entretanto os pesquisadores mencionaram serem necessárias otimizações em relação as características sensoriais, para aplicação da bebida de grão-de-bico, como bebida fermentada.

Recentemente Rincon, Botelho e De Alencar (2020), ao adicionarem extrato de coco em extrato de grão-de-bico, aprimoraram os parâmetros de cor, sabor, odor e textura, avaliados durante análise sensorial da bebida. O efeito do processo de fermentação por microorganismos não foi avaliado no estudo. Contudo, Skrzypczak et al. (2019) ao avaliarem uma bebida de grão-de-bico comercial, posteriormente adicionada de açúcar de baunilha e flocos de coco, fermentada por *Lactobacillus plantarum* 299v, obtiveram melhor aceitabilidade, quando comparada a outras bebidas fermentadas pela mesma estirpe, analisadas sensorialmente no estudo. Presumivelmente a combinação de grão-de-bico e coco parece ser favorável para o desenvolvimento de novas bebidas vegetais. Até o presente momento, existem poucos estudos que investiguem o extrato vegetal de grão-de-bico, ou tampouco associado ao coco, como matriz para o crescimento de bactérias lácticas. Dessa maneira são necessárias mais pesquisas que explorem essa área, em específico o grão-de-bico, tendo em vista a rica composição, benefícios e componentes prebiótico deste tipo de leguminosa.

2.6. Coco

O coco (*Cocos nucifera* L.) é uma monocotiledônea da família *Palmaceae*. É utilizado em muitos alimentos tradicionais, principalmente nas regiões do Pacífico e da Ásia. Um percentual de 90% do total mundial de coco é cultivado na Indonésia, Filipinas, Índia, Sri Lanka e Tailândia. Geralmente, as frutas de coco levam cerca de um ano para todo o desenvolvimento. O fruto maduro contém 35% de casca (revestimento externo), 12% de casca (revestimento interno), 28% de polpa, sendo o endosperma sólido e, 25% de água, sendo o endosperma líquido (PATIL; BENJAKUT, 2018).

Os produtos alimentícios derivados do coco são geralmente obtidos da polpa e do líquido. Os mais conhecidos incluem o óleo de coco, o extrato de coco, a água de coco e a polpa de coco. O extrato de coco especificamente é utilizado como ingrediente em diversas

preparações doces e salgadas. O extrato consiste em um líquido obtido da polpa do coco maduro e pode ser misturado com água para consumo como bebida. Este contém em maior concentração teores de lipídios e umidade (TANSAKUL; CHAISAWANG, 2006; PATIL; BENJAKUT, 2018; MAURO; GARCIA, 2019).

A composição da parte madura depende dos processos de cultivo, maturidade da castanha e localização geográfica, o que conseqüentemente irá afetar a composição do extrato produzido (PATIL; BENJAKUT, 2018). Um estudo realizado por Patil et al. (2017) avaliou as propriedades físico químicas da polpa e do extrato de coco em diferentes estágios de maturação. De acordo com os autores o extrato de coco produzido com polpa de coco maduro apresenta cerca de 61% de umidade, 30% de lipídeos, 3% de proteína, 1% de cinzas e 4% de carboidratos. Sethi, Tyagi e Anurag (2016) ainda relatam que a bebida de coco possui vitaminas e minerais, como ferro, cálcio, potássio, magnésio e zinco e quantidade significativa de vitaminas C e E.

A principal proteína do endosperma do coco é uma globulina conhecida como cocosina, que desempenha papel na estabilização do extrato de coco. Além das aplicações culinárias, o uso do extrato também está associado a benefícios para a saúde. O produto contém ácidos graxos saturados de cadeia média, principalmente ácido láurico, que corresponde a cerca de 50% do óleo de coco. Este é convertido em monolaurina, que pode promover o desenvolvimento das funções cerebrais, estimular as defesas do sistema imunológico e manter a elasticidade dos vasos sanguíneos (PATIL et al., 2017; MAURO; GARCIA, 2019; XIAO et al., 2019).

Apesar do coco ser associado a benefícios à saúde e ser utilizado em preparações culinárias, existem poucas pesquisas que investiguem o extrato de coco em bebidas fermentadas. Um estudo realizado por Mauro e Garcia (2019) investigou a sobrevivência de duas estipes de *Lactobacillus reuteri*, sendo LR 92 e DSM 17938, em bebida de coco. O extrato de coco sem suplementação proporcionou substrato suficiente para crescimento do *Lactobacillus reuteri*, devido a sacarose natural presente na matriz utilizada como fonte para multiplicação bacteriana. No entanto, a maioria dos estudos que investiga a viabilidade de probióticos em preparações de coco é realizada com a água do coco. Por exemplo, uma pesquisa realizada por Kantachote et al. (2017) produziu uma potencial bebida probiótica utilizando água de coco suplementada com 0,5% de glutamato monossódico e fermentada com *Lactobacillus plantarum* DW12, apresentando 8,4 log UFC/mL. Outra pesquisa feita por

Giri et al. (2018) também utilizou a água de coco e a estirpe *Lactobacillus casei L4* para a produção de uma bebida funcional que após 48 horas de fermentação apresentou 9,47 log UFC/mL.

Deste modo são necessários mais estudos que utilizem o extrato de coco na produção de bebidas fermentadas, podendo ainda associá-lo a outras bebidas vegetais para beneficiar o crescimento de microrganismos probióticos.

3. METODOLOGIA

3.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental quantitativo. O estudo foi subdividido nas seguintes etapas: (i) elaboração dos extratos de grão-de-bico e coco e das bebidas à base de grão-de-bico e coco fermentadas com *L. paracasei* LBC 81; (ii) determinação da cinética de crescimento do *L. paracasei* LBC 81 nas bebidas à base de grão e coco; (iii) análise da composição química das bebidas após fermentação; (iv) estabilidade das bebidas fermentadas durante período de estocagem; (v) determinação da sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 na bebida à base de grão-de-bico e coco após exposição a condições de estresse gastrointestinal *in vitro*; (vi) análise estatística dos resultados.

3.2. Elaboração dos extratos vegetais

Os extratos vegetais foram produzidos no Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Ciências Saúde da Universidade de Brasília, de acordo com o protocolo estabelecido por Rincon, Botelho e De Alencar (2020).

3.2.1. Elaboração do extrato vegetal de grão-de-bico

O grão-de-bico utilizado na elaboração das bebidas foi a cultivar Toro FLIP 06–155C safra 20, cedida pela EMPRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) do Distrito Federal. Para condução das análises, o extrato foi preparado em três momentos distintos, um total de 2.800 g de grão-de-bico foram utilizados. O preparo do extrato vegetal de grão-de-bico foi realizado na proporção de 1:4, sendo uma de grão-de-bico (alimento cru) para quatro partes de água. Inicialmente, o grão foi reidratado, no qual ficou de remolho em água potável por 12 horas e, em seguida, a água do remolho foi descartada. Posteriormente, o grão-de-bico foi cozido com água na proporção de 1:3 em panela de pressão doméstica (Rochedo®) a 120 °C e 2,0 atm por 20 min. (após iniciar pressão). Posterior a essa etapa, o grão-de-bico cozido foi processado no Thermomix®, por 1 minuto em potência 8, juntamente com a água restante do cozimento mais a água necessária para completar a proporção de 1:4 em relação a massa seca. Depois de processado, o líquido formado foi coado em *voal* para obtenção do extrato vegetal.

3.2.2. Elaboração do extrato vegetal de coco

O coco utilizado para a elaboração do extrato foi obtido no comércio local de Brasília. Optou-se pelo coco seco, no qual foi retirada a polpa. Para condução das análises, o extrato foi preparado em três momentos distintos, um total de 400 g de polpa de coco foi utilizada. O extrato de coco foi elaborado na proporção de 1:3, sendo uma parte de polpa de coco em pedaços e três partes de água quente (cerca de 90 °C). O coco juntamente com a água foi processado em liquidificador (Philco® modelo PH900) em potência 2 por três minutos e coado em *voal* para obtenção do extrato de coco.

3.2.3. Elaboração das diferentes formulações de bebida vegetal à base dos extratos de grão-de-bico e de coco

Optou-se pela formulação base de melhor composição nutricional e aceitabilidade, conforme Rincon, Botelho e De Alencar (2020), composta de 90% extrato de grão-de-bico e 10% extrato de coco, que em testes preliminares não sofreu alterações visíveis de divisão de fases, mediante tratamento térmico de esterilização (121°C por 15 minutos). As distintas formulações de bebida vegetal à base dos extratos de grão-de-bico e coco foram produzidas com diferentes percentuais de açúcar cristal (sacarose - 2,5%, 5%, 7,5% e 10%), adicionado para servir como fonte de substrato para o micro-organismo no processo de fermentação. Os percentuais foram estabelecidos com base em testes preliminares, em que a adição de 12% de açúcar resultou em acidificação intensa da bebida, assim optou-se por utilizar porcentagens inferiores.

Portanto, após os processos descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2, adicionou-se ao extrato de grão-de-bico uma proporção de extrato de coco, resultando em uma bebida 90% extrato de grão-de-bico e 10% extrato de coco. O *blend* foi homogeneizado manualmente com auxílio de uma colher. Foram produzidos e analisados uma formulação controle e quatro diferentes tratamentos, sendo (i) controle com 90% extrato de grão-de-bico, 10% extrato de coco e 0% adição de açúcar; (ii) tratamento 1 com 90% extrato de grão-de-bico, 10% extrato de coco e 2,5% adição de açúcar cristal; (iii) tratamento 2 com 90% extrato de grão-de-bico, 10% extrato de coco e 5% adição de açúcar cristal; (iv) tratamento 3 com 90% extrato de grão-de-bico, 10% extrato de coco e 7,5% adição de açúcar cristal; (v) tratamento 4 com 90% extrato de grão-de-bico, 10% extrato de coco e 10% adição de açúcar cristal.

As formulações com distintas concentrações de açúcar foram homogeneizadas novamente, também de forma manual com o auxílio de uma colher, até dissolução do açúcar. Em seguida, todos os tratamentos incluindo a formulação controle foram divididos em três partes iguais, para análises em triplicata, distribuídos 300 mL em potes de vidro com tampa rosqueável e transportados em caixas térmicas devidamente higienizadas para o Laboratório de Higiene dos Alimentos da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília. Posteriormente, as formulações foram submetidas a esterilização (121°C por 15 minutos) e resfriadas a temperatura ambiente para elaboração da bebida fermentada.

3.3. Elaboração da bebida fermentada

A cultura comercial de *L. paracasei* LBC 81 (marca DuPont™) foi utilizada na elaboração das bebidas fermentadas. A cultura faz parte da coleção de culturas do Laboratório Interdisciplinar de Biociências da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. A partir da cultura estoque foi preparado um novo estoque desta cultura para a elaboração das formulações de bebida fermentada.

3.3.1. Preparo da cultura estoque de *L. paracasei* LBC 81

Para o preparo da cultura estoque inoculou-se 50 µL da cultura estocada em freezer a -80°C em 5 mL de caldo MRS, em seguida, a cultura foi incubada em estufa bacteriológica 37 °C/16 h. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL da cultura ativa foi adicionada em 10 mL de caldo MRS permanecendo em estufa bacteriológica nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Para confirmação da pureza da cultura, a mesma foi estriada em placa de Petri contendo MRS ágar e, em seguida, a placa foi incubada em estufa bacteriológica 37 °C/24 h. Posteriormente colônias selecionadas da placa de Petri, com o auxílio da alça de Niquel Cromo, foram adicionadas em 10 mL de caldo MRS, e imediatamente incubadas em estufa bacteriológica para obtenção de cultura ativa em meio líquido. Para o armazenamento, posteriormente centrifugou-se o caldo MRS (2.655 x g, 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com caldo MRS, em seguida foi centrifugado nas mesmas condições e adicionado de caldo MRS com 20% de glicerol. A cultura ativa foi armazenada em tubo eppendorf com capacidade de 2 mL e imediatamente foram estocados em freezer a -80 °C.

Todos experimentos foram realizados a partir da cultura estoque. Assim uma pequena quantidade da cultura estoque foi submetida ao processo de ativação em caldo MRS e incubação em estufa bacteriológica a 37 °C/16 h. No entanto, a ativação final foi realizada em tubos Falcon contendo 10 mL da bebida 90% grão-de-bico e 10 % coco, sob as mesmas condições de incubação, isto para a adaptação do micro-organismo ao meio.

3.3.2. Determinação do inóculo de *L. paracasei* LBC81 para elaboração das bebidas fermentadas

Para estabelecer a quantidade do inóculo utilizado para a elaboração das bebidas fermentadas, foram realizados teste preliminares. Inicialmente diferentes porcentagens de inóculo (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) foram adicionadas nas bebidas à base de grão-de-bico e coco, em seguida as bebidas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C/14 h. O pH das bebidas foi aferido antes, imediatamente após a adição do inóculo e, posterior ao período de incubação. Também determinou-se a viabilidade do micro-organismo presente nas bebidas após período de incubação, por meio da técnica de plaqueamento *Drop plate*.

Quanto maior a concentração de inóculo adicionada às bebidas, menor foi o pH obtido após as 14 h de incubação e menor foi a contagem de UFC. A adição de menos de 4% da cultura também proporcionou menores contagens de UFC. Assim optou-se por utilizar a concentração de 4% da cultura (contendo aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) nas diferentes formulações de bebida à base de grão-de-bico e coco.

3.3.3. Determinação da cinética de crescimento

Os parâmetros cinéticos de crescimento avaliados foram: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais (avaliados em intervalos regulares, de uma ou duas horas, após a inoculação do micro-organismo), e viabilidade microbiana (determinada após a inoculação do micro-organismo e após processo de fermentação das bebidas). Posterior a adição de 4% de inóculo nas diferentes bebidas, as mesmas permaneceram em estufa bacteriológica a 37 °C até atingirem valores de pH em torno de 4,6 a 4,8. Este foi o parâmetro para caracterizar o final do processo fermentativo.

3.3.3.1. pH

O pH foi determinado por meio do pHmetro de bancada digital (modelo PHS – 3E), devidamente calibrado com solução tampão de pH 4 e pH 6. Com auxílio de uma micropipeta automática (modelo Labmate Pro – HTL) foram retirados 10 mL de cada amostra, dispostas em béqueres de vidro. O bulbo do pHmetro foi inserido completamente nas amostras e aguardados segundos para estabilização e foram obtidos os valores de pH. Após aferição de cada amostra, o bulbo do pHmetro foi lavado devidamente com água destilada.

3.3.3.2. Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL,2008). Para determinação da acidez titulável foram coletados 10 g das amostras, adicionados 100 mL de água destilada e a titulação foi realizada com solução de NaOH 0,1 M e solução fenolftaleína como indicador. Utilizou-se a equação 1 para obtenção dos resultados expressos em g/100 g de ácido láctico.

$$\text{Acidez Titulável} = \frac{V \times F \times M \times PM}{10 \times P \times n} \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

V= volume de solução NaOH gasto na titulação (mL);

M= molaridade da solução;

P= massa da amostra (g);

PM= massa molecular do ácido láctico;

n= número de hidrogênios ionizáveis;

F= fator da correção da solução de NaOH.

3.3.3.3. Sólidos Solúveis Totais

Os sólidos solúveis totais foram determinados através do refratômetro digital (Atago modelo 1T), de acordo com o método 932.12 (AOAC 2005). Alíquotas de cada amostra homogeneizada foram utilizadas e os resultados foram expressos em °Brix.

3.3.3.4. Determinação da viabilidade

A viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 foi determinada pela técnica *Drop plate* (plaqueamento por microgotas) em meio de cultura MRS ágar. As amostras de bebida vegetal foram submetidas a diluições seriadas em solução salina 0,85%, e posteriormente as diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas em MRS ágar e incubadas em condição aeróbia a 37°C por 48 horas. Após período de incubação, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nas diluições que apresentaram entre 20 a 80 colônias. Este procedimento foi realizado imediatamente após o processo de inoculação da cultura *L. paracasei* LBC 81 nas diferentes formulações e ao final do processo fermentativo. Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

3.4. Caracterização química das bebidas

Posteriormente ao processo de fermentação, as diferentes bebidas foram transportadas em caixa térmica devidamente higienizada para o Laboratório de Análise de Alimentos, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, para condução das análises de caracterização química.

3.4.1. Umidade

A umidade foi determinada de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), no qual seguiu-se duas etapas. Primeiro as amostras foram pesadas (cerca de 400 g) e colocadas em recipientes de porcelana, na sequência foram submetidas à estufa a 60 °C por 24 horas, para parcial evaporação da água e concentração da matriz, até obterem peso constante. Logo após, foram pesados cerca de 2 g das amostras em cadinhos, que permaneceram em estufa a 105 °C por 4 horas, até obterem peso constante. A umidade foi expressa em porcentagem de base úmida, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(m_1 + m_2)}{m_t} \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

m_1 = massa de água evaporada na primeira etapa (g);

m_2 = massa de água evaporada na segunda etapa (g);

m_t = massa da amostra (g).

3.4.2. Proteína

O teor de proteína foi realizado pelo método de Kjeldahl 991.22 (AOAC, 2005). Cerca de 2 g de cada amostra foram alocados em tubos contendo 1 g de mistura catalítica, após foi adicionado 3,5 mL de H_2SO_4 4%, seguindo para bloco digestor a 450 °C. Posteriormente, as amostras foram acrescidas de 10 mL de água destilada para destilação do nitrogênio realizada com o destilador Tecnal (modelo TE – 036/1). Para cada amostra, cerca de 7,5 mL de H_3BO_3 foram adicionados em béqueres de vidro e 4 gotas de azul de metileno foram usadas como indicador. Os tubos contendo as amostras e os béqueres com solução de ácido bórico foram alocados no destilador, NaOH 50% foi adicionado no copo medidor do aparelho e, em seguida, iniciou-se o processo de destilação. Realizou-se a titulação com HCl 0,1 M até as amostras atingirem o ponto de viragem. A obtenção do nitrogênio foi expressa em porcentagem pela seguinte equação:

$$\%N = \frac{V \times M \times f \times 14 \times 100}{m} \quad \text{Equação (3)}$$

Em que:

V = volume gasto da solução de HCl na titulação;

M = molaridade da solução de HCl;

f = fator de correção da solução de HCl;

m = massa da amostra (mg).

A obtenção do teor de proteína foi determinada pelo fator de conversão de nitrogênio (% N) de 6,25, baseado na seguinte equação:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N} \times 6,25 \quad \text{Equação (4)}$$

3.4.3. Lipídio

O teor lipídico total foi determinado pelo método de extração Am 5-04, utilizando o extrator de lipídios (modelo ANKOM XT15 da *Ankom Technology, New York, United States of America*) (AOCS, 2005). Após submissão à estufa a 60 °C por 24 horas, para parcial evaporação da água e concentração da matriz, como descrito no item 3.4.1, pesou-se cerca de 1 g de cada amostra, no qual foram colocadas em sacos de extração de lipídios e alocadas em cartuchos apropriados do extrator. Foi utilizado éter de Petróleo como solvente para a extração. Em seguida, as amostras foram inseridas em estufa a 105°C, para evaporação do solvente, e pesadas. Os valores de lipídio foram obtidos pela diferença de massa após extração, utilizou-se também a massa das amostras em base úmida, assim o teor de lipídio foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{(100 \times m_l)}{m} \quad \text{Equação (5)}$$

Em que:

m_l = gramas de lipídeos extraídos

m = gramas de amostra em base úmida

3.4.4. Resíduo mineral

O teor de resíduo mineral (cinzas) foi realizado pelo método 945.45 (AOAC, 2005). As amostras foram pesadas, dispostas em cadinhos, submetidas à mufla em temperatura de 600°C e após foram pesadas novamente. A determinação de resíduo mineral é obtida pela perda de massa orgânica da amostra, assim o percentual de cinzas foi dado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{100 \times m_C}{m} \quad \text{Equação (6)}$$

Em que:

m_C = massa de cinzas (g)

m = massa da amostra (g)

3.4.5. Carboidrato e valor energético

O teor de carboidratos totais presente nas diferentes formulações foi determinado pela diferença, subtraindo-se de 100 os valores encontrados para umidade, teor de proteína, teor de lipídios e teor de cinzas, conforme método 986.25 (AOAC, 2005). Os valores de carboidratos foram obtidos pela seguinte equação:

$$\% \text{ CHO} = 100 - \% \text{ Umidade} - \% \text{ Proteína} - \% \text{ Lipídeo} - \% \text{ Cinzas} \quad \text{Equação (7)}$$

O valor energético das diferentes formulações foi calculado obtendo-se a quantidade em gramas de carboidratos, proteínas e lipídios, multiplicados por 4, 4 e 9 kcal, respectivamente, conforme Mahan e Escott-Stump (2005).

3.4.6. Teor de sódio, potássio e cálcio

Ainda foram determinados os teores de sódio (Na), potássio (K) e cálcio (Ca) através do fotômetro de chama AP-1302 (LABNOVA®), segundo método 969.23 (AOAC, 2005). Utilizou-se as cinzas conforme descrito no item 3.4.4. Posteriormente as cinzas de cada amostra foram diluídas em água destilada em balões volumétricos de 100 mL e filtradas em filtro de papel qualitativo. Especificamente para determinação de cálcio, as amostras foram diluídas novamente (fator de diluição 5). Para a obtenção dos valores de minerais, o equipamento foi calibrado de acordo com as soluções padrão dos minerais Na, K e Ca (marca SpecSol®), com curvas de 0 a 100 ppm ($R^2 = 0,947$), 0 a 150 ppm ($R^2 = 0,960$) e 0 a 50 ppm ($R^2 = 0,999$) respectivamente. As leituras foram realizadas inserindo o cateter do fotômetro no

balão volumétrico contendo as amostras. Os resultados obtidos em ppm foram convertidos e expressos em mg/100 g.

3.5. Caracterização das bebidas durante armazenamento refrigerado

Os parâmetros tecnológicos e a viabilidade do micro-organismo nas bebidas fermentadas foram analisados após a fermentação e durante o período de estocagem (3°, 5°, 7° e 10° dias) a 4°C em câmara climática (modelo MA 415 Marconi, Piracicaba, Brasil).

Para os parâmetros tecnológicos, o pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais foram determinados conforme itens 3.3.3.1, 3.3.3.2 e 3.3.3.3. A avaliação da cor foi realizada por espectrofotometria com o auxílio do espectrofotômetro (modelo ColorQuest XE HunterLab, Reston, Estados Unidos), utilizando espectro de comprimento de ondas de 400 a 700 nm, obtendo-se os valores das coordenadas L*, a* e b* do sistema Hunter. A partir dos valores das coordenadas L*, a* e b* foram obtidos os parâmetros relacionados à tonalidade da cor ou hue angle (h*, Equação 8) e à saturação da cor ou croma (C*, Equação 9) (FRANCIS, 1975; MCLELLAN, LIND E KIME, 1995).

$$h^* = \arctang(b^*/a^*) \quad \text{Equação (8)}$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Equação (9)}$$

Em que:

L - mensurável em termos de intensidade de branco a preto;

a - mensurável em termos de intensidade de vermelho e verde;

b - mensurável em termos de intensidade de amarelo e azul.

A viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 durante o período de estocagem foi avaliado de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.3.4.

3.6. Determinação da sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 na bebida à base de grão-de-bico e coco após exposição a condições de estresse gastrointestinal *in vitro*.

A sobrevivência da cultura foi analisada na bebida de grão-de-bico e coco fermentada com adição de 10% de açúcar cristal (BGCF), por se assemelhar as bebidas fermentadas que existem no mercado com 12% de adição de açúcar.

Para verificar o efeito da matriz e da fermentação na sobrevivência do *L. paracasei* LBC 81, foram considerados os respectivos controles: Controle 1 – suspensão de células em solução salina (SCSS): a cultura na sua forma ativa em meio líquido, foi centrifugada (2.655 x g, 4 °C, 5 minutos) e ressuspensa em solução salina 0,85% com pH ajustado para 6,5. Controle 2 – suspensão de células em bebida de grão-de-bico e coco (SCGC): a bebida à base de grão-de-bico e coco foi elaborada conforme item 3.2, adicionada de 10% de açúcar e 4% do inóculo (contendo aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), no entanto esta não foi submetida ao processo de fermentação.

Conforme protocolo estabelecido por Bautista-Gallego et al. (2013), a suspensão de células em solução salina 0,85%, e as bebidas fermentada e não fermentada, no 1º e no 8º dia de armazenamento (4 °C), foram submetidas as seguintes condições: (i) exposição ao suco gástrico simulado; (ii) exposição ao suco pancreático simulado; e (iii) exposição aos sucos gástrico e pancreático simulados em condições sucessivas.

3.6.1. Determinação da sobrevivência após exposição ao suco gástrico simulado

O suco gástrico sintético foi preparado com 150 mL de solução tampão. Esta solução foi preparada com NaCl (0,375 g), K₂HPO₄ (0,09 g), CaCl₂ (0,0165 g), KCl (0,0555 g) e 150 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1 M e posteriormente, a solução foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Para a condução das análises a solução tampão foi dividida em três partes iguais (50 mL), no dia da realização dos experimentos esta foi adicionada de solução de pepsina (5 µL/50 mL) (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil) e lisozima (50 µL/50 mL) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO).

Aliquotas de 100 µL da bebida fermentada foram adicionadas em 900 µL do suco gástrico e em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 3 horas. A suspensão

de células em solução salina 0,85% e em bebidas não fermentada (controle 1 e 2) foram submetidas ao mesmo processo. Após período de incubação, foram centrifugados ($2.655 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 minutos). O *pellet* obtido foi lavado com solução salina 0,85 % e posteriormente centrifugado nas mesmas condições. O *pellet* obtido foi suspenso em solução salina 0,85% e diluições em até 10^{-6} foram realizadas. As diluições foram plaqueadas em ágar MRS pela técnica *Drop plate*, e, posteriormente, incubadas em condição aeróbia a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. O número de UFC foi determinado após o período de incubação, expressos em log UFC/mL.

3.6.2. Determinação da sobrevivência após exposição ao suco pancreático simulado

O suco pancreático sintético foi preparado com 150 mL de solução tampão. Esta solução foi preparada com fosfato de sódio dibásico heptahidratado (7,6215 g), NaCl (1,275 g) e 50 mL de água destilada. Adicionou-se a solução sais biliares (0,45 g) (marca Sigma-Aldrich®) e o pH da solução foi ajustado para 8,0. Posteriormente, a solução foi autoclavada a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Para a condução das análises, a solução tampão foi dividida em três partes iguais (50 mL), no dia da realização dos experimentos e esta foi adicionada de solução de pancreatina (500 $\mu\text{L}/50\text{mL}$) (marca Sigma-Aldrich®).

Alíquotas de 100 μL da bebida fermentada foram adicionadas em 900 μL do suco pancreático e em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. A suspensão de células em solução salina 0,85% e em bebidas não fermentada (controle 1 e 2) foram submetidas ao mesmo processo. Após este período de incubação, os tratamentos foram centrifugados ($2.655 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 minutos). O *pellet* obtido foi lavado com solução salina 0,85 % e, posteriormente, centrifugado nas mesmas condições. O *pellet* obtido foi suspenso em solução salina 0,85% e diluições em até 10^{-6} foram realizadas. As diluições foram plaqueadas em ágar MRS pela técnica *Drop plate*, e, posteriormente, incubadas em condição aeróbia a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. O número de UFC foi determinado após o período de incubação, expressos em log UFC/mL.

3.6.3. Determinação da sobrevivência após exposição aos sucos gástrico e pancreático em condições sucessivas

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.6.1 e 3.6.2, exceto que após a exposição ao suco gástrico por 3 horas, a bebida à base de grão-de-bico e coco fermentada e respectivos controles foram expostos também ao suco pancreático por 4 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

3.6.4. Determinação da porcentagem de sobrevivência

A partir da obtenção dos valores de log UFC/mL, após exposição as condições gastrointestinais *in vitro* da bebida de grão-de-bico e coco fermentada, suspensão de células em solução salina 0,85% (controle 1) e em bebida não fermentada (controle 2), foi determinada a porcentagem de sobrevivência do *L. paracasei* LBC 81, através da seguinte equação:

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \log N_1 / \log N_0 \times 100$$

Equação 10

Em que:

N_1 = contagem viável total (log UFC/mL), após a exposição as condições de estresse gastrointestinal *in vitro*.

N_0 = viabilidade total (log UFC/mL) antes da exposição as condições de estresse gastrointestinal *in vitro*.

3.7. Análise estatística dos resultados

Para as variáveis relacionadas a cinética de crescimento e estabilidade durante período de estocagem das bebidas fermentadas foi realizada análise de regressão. Para a viabilidade microbiana (imediatamente após a inoculação, após processo de fermentação e durante período de estocagem) e composição química, foi realizada ANOVA com subsequente teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise de sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81

após condições de estresse gastrointestinal *in vitro*, foram considerados o tratamento de bebida fermentada, suspensão de células em solução salina (controle 1) e suspensão de células em bebida de grão-de-bico não fermentada (controle 2). ANOVA com subsequente teste de Tukey a 5% de probabilidade foi realizada. O software SigmaPlot v. 10.0 (Systat Software Inc, Erkrath, Germany) foi utilizado para obter as equações de regressão e construção dos gráficos. O software StatPlus® 5 Pro (AnalystSoft Inc, Estados Unidos) foi usado para a análise de variância e teste de Tukey. Para cada experimento, três repetições foram consideradas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cinética de crescimento

As formulações de grão-de-bico e coco com diferentes teores de açúcar foram avaliadas durante o processo fermentativo. As variáveis como pH, AT e SST mensuraram indiretamente o crescimento microbiano (Figura 2 e Tabela 3) e, a viabilidade obtida através da contagem de UFC mensurou de forma direta o crescimento da estirpe *L. paracasei* LBC 81 nas formulações de bebida de grão-de-bico e coco.

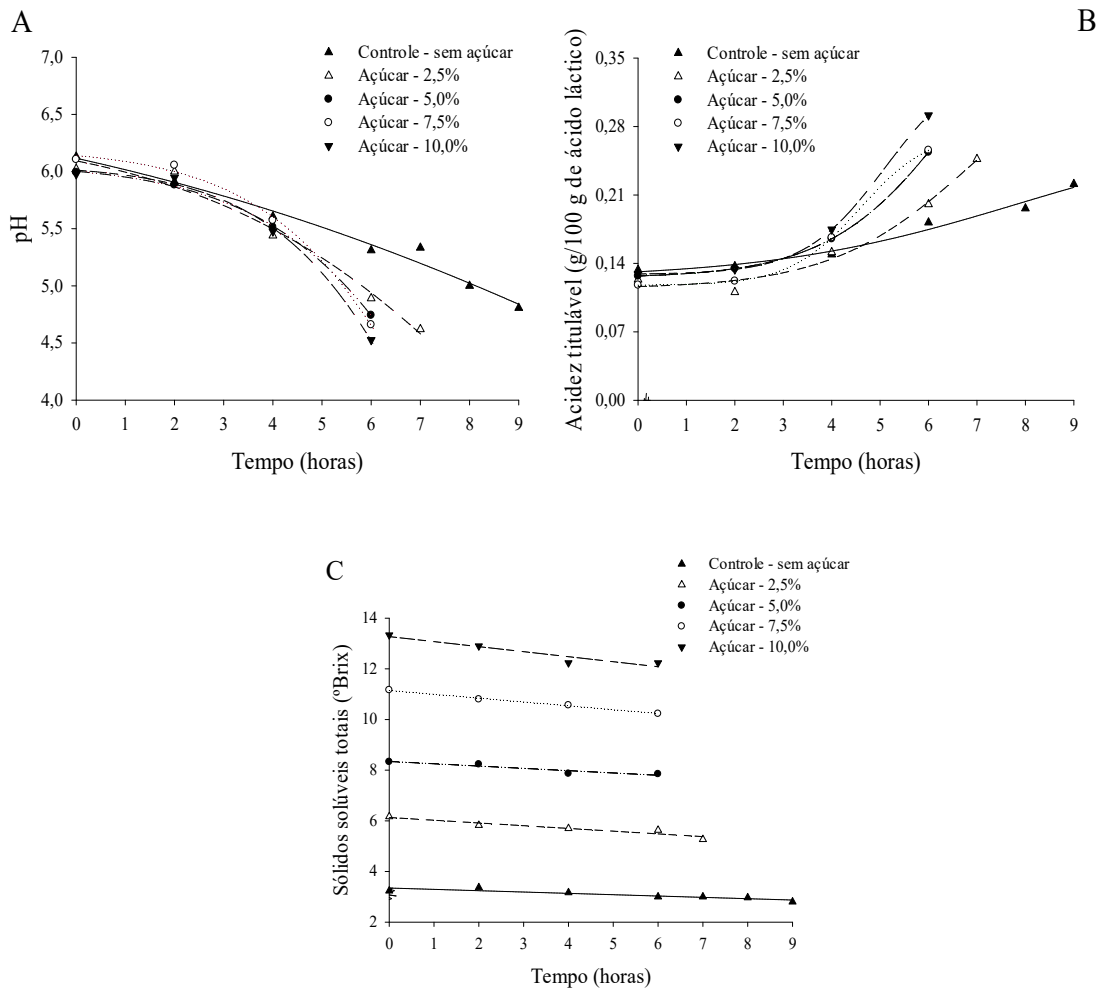


Figura 2. Curvas de regressão de pH (A), acidez titulável (AT) em g/100 g de ácido láctico (B) e sólidos solúveis totais em °Brix (SST) (C) em relação ao período de fermentação das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por *L. paracasei* LBC 81.

Tabela 3. Equações de regressão de pH, acidez titulável (TA, g/100g de ácido láctico) e sólidos solúveis totais (SST, °Brix) durante período de fermentação (x) das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por *L. paracasei* LBC 81.

Variáveis	Teor de açúcar	Equações ajustadas	R ²	EPE
pH	0% (Controle)	$\hat{y} = \frac{6,968}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-15,420}{-7,829}\right)}\right)}$	0,98	0,079
	2,5%	$\hat{y} = \frac{6,403}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-10,133}{-3,402}\right)}\right)}$	0,98	0,123
	5,0%	$\hat{y} = \frac{6,078}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-8,455}{-1,939}\right)}\right)}$	0,99	0,019
	7,5%	$\hat{y} = \frac{6,209}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-7,943}{-1,773}\right)}\right)}$	0,99	0,073
	10,0%	$\hat{y} = \frac{6,067}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-7,774}{-1,652}\right)}\right)}$	0,99	0,075
AT	0% (Controle)	$\hat{y} = 0,125 + \frac{0,153}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-7,850}{2,590}\right)}\right)}$	0,98	0,008
	2,5%	$\hat{y} = 0,114 + \frac{0,259}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-6,25}{1,460}\right)}\right)}$	0,98	0,016
	5,0%	$\hat{y} = 0,125 + \frac{0,341}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-6,660}{1,321}\right)}\right)}$	0,99	0,005
	7,5%	$\hat{y} = 0,118 + \frac{0,158}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-4,87}{0,727}\right)}\right)}$	0,99	0,002
	10,0%	$\hat{y} = 0,129 + \frac{0,219}{\left(1 + e^{\left(\frac{-1x-5,103}{0,875}\right)}\right)}$	0,99	0,004
SST	0% (Controle)	$\hat{y} = 3,347 - 0,053x$	0,83	0,087
	2,5%	$\hat{y} = 6,128 - 0,108x$	0,90	0,120
	5,0%	$\hat{y} = 8,343 - 0,091x$	0,88	0,102
	7,5%	$\hat{y} = 11,147 - 0,152x$	0,99	0,029
	10,0%	$\hat{y} = 13,270 - 0,198x$	0,90	0,209

EPE = Erro padrão da estimativa; n= três repetições.

O valor estimado inicial de pH das formulações foi cerca de 6,0, com tendência de decréscimo ao longo do período de fermentação (Figura 2A). Ao definir o valor de pH entre 4,5 a 4,8, como final do processo fermentativo, observou-se que a redução dos valores de pH foi inversamente proporcional ao aumento dos teores de açúcar das formulações, resultando em tempos distintos de fermentação. A formulação elaborada com maior teor de açúcar (10%), após 6 h de fermentação, alcançou pH estimado final de 4,52. A formulação controle (0% de açúcar), após 9 h de fermentação alcançou pH estimado final de 4,84. Vogado et al. (2018) avaliaram o crescimento do *L. paracasei* LBC 81 em leite desnatado suplementado com 10% de açúcar, utilizando as mesmas condições de incubação (37 °C) e maior concentração de inóculo (10%). Embora a formulação tivesse maior concentração de inóculo comparada àquelas elaboradas no presente estudo, para atingir valor de pH de 5,37 foram necessárias 14 h de fermentação. Ao contrapor os resultados, a formulação de grão-de-bico e coco sem adição de açúcar parece ser suficiente para crescimento da estirpe *L. paracasei* LBC 81, considerando seu menor tempo de fermentação (9 h), otimizado com o teor de 10% de açúcar (6 h). O grão-de-bico possui quantidades consideráveis de aminoácidos livres, o que proporciona crescimento mais acelerado dessas bactérias neste substrato. No leite, a presença de aminoácidos livres é limitada, estando presentes como componentes proteicos, o que leva as BAL a hidrolisarem as proteínas do leite para utilização como fonte de carbono (BINTSIS, 2018). Outro fator a ressaltar é que grão-de-bico possui quantidades de carboidratos de 50-70 g/ 100 g (HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017), dentre eles oligossacarídeos. Em específico, a rafinose é mencionada como um dos componentes presente em leguminosas que pode proporcionar maior atividade metabólica de BAL (ZARE et al., 2012; CHEN et al., 2018; HUSSEIN et al., 2020). É possível que o teor de carboidratos contido na formulação de grão de bico e coco sem adição de açúcar influenciou positivamente no crescimento da estirpe *L. paracasei* LBC 81.

O valor estimado inicial de AT para as formulações foi cerca de 0,13 g/100 g de ácido láctico, com tendência de aumento ao longo do período de fermentação (Figura 2B). Maiores teores de açúcar resultaram em maior AT, inversamente proporcional aos resultados obtidos para os valores de pH, o que era esperado. Ao final do processo de fermentação, a formulação controle (0% de açúcar) apresentou valor estimado para AT de 0,22 g/100 g de ácido láctico e a formulação com 10% de açúcar apresentou valor estimado de 0,29 g/100 g de ácido láctico. A maior AT, obtida para as formulações com maiores teores de açúcar pode ser explicada

novamente pela atividade metabólica do micro-organismo. A sacarose é considerada boa fonte de carbono, possivelmente a estirpe também tenha utilizado a sacarose presente nas formulações, liberando quantidades de ácidos orgânicos, o que resultou no aumento do ácido láctico nas distintas formulações (DAVOODI et al. 2016).

As formulações com os maiores teores de açúcar apresentaram valores mais elevados de SST (Figura 2C). A formulação controle (0 % de açúcar) apresentou inicialmente valor estimado de 3,35 °Brix, já a formulação com 10,0 % de açúcar apresentou valor estimado de 13,27 °Brix. Durante o período de fermentação, foi observada uma leve tendência de redução dos teores de SST, sendo ainda mais acentuada com o aumento do teor de açúcar. Resultados semelhantes foram obtidos por Norberto et al. (2018), que observaram redução dos SST em bebida de soja fermentada por grãos kefir, devido ao consumo de carboidratos ao longo do processo de fermentação. É possível que nas formulações da bebida de grão-de-bico e coco, a discreta tendência de redução dos teores SST esteja associada ao consumo de açúcares por *L. paracasei* LBC 81.

Quanto à viabilidade do micro-organismo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações, sendo somente observada com relação a contagem média inicial ($7,24 \pm 0,22$ log UFC/g) e final ($8,60 \pm 0,17$ log UFC/g) no processo fermentativo. Esses dados sugerem novamente que a formulação sem adição de açúcar (controle) forneceu nutrientes suficientes para o crescimento de *L. paracasei* LBC 81. Wang, Chelikani e Serventi (2018) avaliaram a bebida à base de grão-de-bico, sem adição de açúcares e, constataram que o produto apresenta boa fermentabilidade ao utilizar cultura mista de BAL (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*). Chen et al. (2018) relataram que os prebióticos, como galacto-oligosacarídeo (GOS) existentes no grão-de-bico, favoreceram o crescimento do *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* YO-MIX 883. Skrzypczak et al. (2019) relataram que durante a fermentação, as proteínas presentes em leguminosas também podem ser hidrolisadas por enzimas proteolíticas dos microrganismos. É possível que a estirpe *L. paracasei* LBC 81 tenha exercido atividade proteolítica, o que favoreceu o bom crescimento nas formulações. Oneca et al. (2007) encontraram enzimas proteolíticas em estipes de *L. paracasei* isoladas de leite ovino. Além disso, é possível que os nutrientes presentes no coco tenham influenciado positivamente o crescimento microbiano. Mauro e Garcia (2019) relataram bom crescimento das estirpes *L. reuteri* LR 92 e *L. reuteri* DSM 17938 em bebida de coco. O coco possui alto teor de antioxidantes e minerais como ferro, magnésio e zinco (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016), o que possivelmente tenha enriquecido

ainda mais a bebida de grão-de-bico, favorecendo o crescimento da estirpe *L. paracasei* LBC 81.

Diante da análise dos dados, é possível mencionar que a bebida de grão-de-bico e coco sem adição de açúcar mostrou-se boa fonte para o crescimento do *L. paracasei* LBC 81. Este resultado é interessante para o desenvolvimento de bebidas com redução de açúcares, tendo em vista que o alto consumo de açúcar vem sendo associado ao surgimento de comorbidades como obesidade e diabetes tipo 2 (CLEGHORN et al., 2019). Portanto, a formulação sem adição de açúcar seria suficientemente viável para a fermentação por *L. paracasei* LBC 81, devido aos seus constituintes nutricionais que favoreceram o crescimento da estirpe.

4.2. Composição química

A composição das formulações de bebida de grão-de-bico e coco foi determinada após processo de fermentação (Tabela 4). Os valores de umidade apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), conforme aumento do teor de açúcar das bebidas. Tais resultados foram esperados, visto que ao se aumentar o teor de açúcar, proporcionalmente eleva-se a quantidade de SST e a umidade é reduzida. Quanto ao resíduo mineral (cinzas), não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as formulações.

Tabela 4. Composição química das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por *L. paracasei* LBC 81.

Formulações	Valor energético (kcal/100 g)	Umidade (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Lipídeo (g/100 g)	Carboidrato (g/100 g)	Na (mg/100 g)	Ca (mg/100 g)	K (mg/100 g)
Controle	31	93,65±0,01a	0,33±0,01a	1,27±0,06a	1,53±0,05a	3,07±0,09e	4,76±0,60c	315,38±4,27a	95,29±2,32a
2,5% de açúcar	41	91,14±0,23b	0,33±0,01a	1,25±0,04a	1,54±0,07a	5,55±0,24d	4,19±0,22c	297,24±12,05ab	91,98±2,51a
5,0% de açúcar	44	90,33±0,02c	0,31±0,01a	1,13±0,18a	1,32±0,03a	6,90±0,17c	7,62±0,94b	291,83±3,13b	90,61±0,73a
7,5% de açúcar	57	87,11±0,17d	0,30±0,01a	1,15±0,15a	1,43±0,07a	9,85±0,23b	5,90±0,58bc	288,76±11,40b	94,58±2,23a
10,0% de açúcar	74	83,04±0,21e	0,30±0,02a	1,15±0,03a	1,41±0,08a	14,22±0,22a	11,41±0,57a	297,35±4,15ab	93,66±0,67a

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; n = três repetições.

Em relação ao teor de proteína, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). A formulação controle (0% de açúcar) e a formulação com adição de 10 % de açúcar apresentaram valores de 1,27 e 1,15 g/100 g, respectivamente. Tais valores de proteínas são inferiores ao contido no leite de vaca com 3,28 g/ 100 g (VANGA; RAGHAVAN, 2018). O leite fermentado por *L. paracasei* LBC 81 suplementado com 10% de açúcar apresentou valor de proteína de 2,71 g/100 g (VOGADO et al 2018). A soja é muito utilizada como alternativa para produtos lácteos e apresenta teor de proteína considerável. Vieira et al. (2019) obtiveram proteína de 3,72 g/100 g em bebida de soja fermentada por *L. acidophilus* LA-5. Apesar disso, um fator limitante está associado ao sabor da soja. Šertović et al. (2019) apresentaram baixa aceitabilidade para bebida de soja fermentada pela mesma estirpe. Contudo, as formulações de bebida de grão-de-bico e coco apresentaram maior quantidade de proteína quando comparada a outras bebida vegetais utilizadas para fermentação, como a bebida de aveia com teor proteico de 0,65g/100 mL (BERNAT et al. 2013) e bebida de arroz com 0,32 g/100 g (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações em relação ao teor de lipídeo. Os valores variaram de 1,32 a 1,53 g/100 g. Estes resultados diferem dos achados de Wang, Chelikani e Serventi (2018) que obtiveram teor de lipídeo de 0,34 g/100 g em bebida de grão-de-bico, posteriormente fermentada por cultura mista de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*. No presente estudo, os teores de lipídeos encontram-se mais elevados devido a adição do extrato de coco nas formulações. O coco tem cerca de 20 % de gordura (PATIL; BENJAKUL, 2018). Rincon, Botelho e De Alencar (2020) utilizaram o extrato de coco em bebida de grão-de-bico para obter teor de lipídeo próximo ao contido em leite de vaca. O aumento da proporção de extrato de coco na bebida resultou em valores para lipídeo de 1,08 a 3,43 g/100 g.

Para os teores de carboidratos totais, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) conforme o aumento do açúcar adicionado nas formulações, variando de 3,07 a 14,22 g/100 g. A formulação controle (0% de açúcar) apresentou quantidade de carboidrato proveniente do grão-de-bico e coco, semelhante ao encontrado para leite de vaca com valor de carboidrato de 4,65 g /100 g (VANGA; RAGHAVAN, 2018). A formulação com 10% de açúcar apresentou teor de carboidrato próximo ao obtido para leite fermentado por *L. paracasei* LBC 81, suplementado com 10% de açúcar com teor de 10,14 g /100 g (VOGADO et al., 2018). Ainda, o aumento do teor de açúcar resultou em aumento do valor energético das formulações com valores de 31 a 74 kcal/100g. Segundo a World Health Organization

(2015), benefícios a saúde podem ser obtidos se o consumo diário de açúcar for reduzido para 5% da ingestão total de calorias. Deste modo, a formulação sem adição de açúcar se destaca, por apresentar menor valor calórico e ser suficiente para crescimento da estirpe *L. paracasei* LBC 81, sem necessidade de adição de açúcares.

Quanto aos minerais, as diferenças significativas ($p < 0,05$) observadas para os teores de Na e Ca não podem ser correlacionadas diretamente com as concentrações de açúcar das formulações, visto que o açúcar adicionado não é fonte destes micronutrientes (Na e Ca). Possivelmente, as diferenças podem estar relacionadas aos metabolitos obtidos durante o processo de fermentação por *L. paracasei* LBC 81. Pereira et al. (2018) mencionam que durante o processo fermentativo, por ocorrer hidrólise dos componentes da matriz, as bactérias probióticas podem produzir e secretar moléculas funcionais, incluindo antioxidantes, enzimas, ácidos graxos de cadeia curta, peptídeos, vitaminas e minerais.

Para os teores de sódio, a formulação controle e a formulação com 10% de açúcar apresentaram valores de 4,76 e 11,41 mg/100 g, respectivamente. Esses resultados são inferiores ao encontrado em leite de vaca, utilizado em grande escala para a elaboração de produtos fermentados, com teor de sódio de cerca de 50 mg/100 g (VANGA; RAGHAVAN, 2018). O menor teor de sódio obtido nas formulações é um fator positivo, tendo em vista que o aumento do consumo deste micronutriente, presente principalmente em alimentos industrializados, está associado ao desenvolvimento de doenças renais, hipertensão e osteoporose (HWANG et al., 2017).

O cálcio é um importante micronutriente relacionado ao crescimento e manutenção da massa óssea (ZHU; PRINCE, 2012). Os teores de cálcio das formulações apresentaram valores entre 288,76 e 315,38 mg/100 g. Tais resultados são superiores aos obtidos no estudo de Kravić et al. (2012) para bebidas lácteas fermentadas, com teor de cálcio de cerca de 120 mg/100 g. Comumente os produtos lácteos são considerados excelentes fontes de cálcio (RIZZOLI; BIVER, 2018), grande parte das bebidas vegetais são suplementadas com sais de cálcio para equivalerem ao teor encontrado no leite (MÄKINEN et al. 2016). As formulações fermentadas de bebida de grão-de-bico e coco podem ser consideradas vantajosas, tendo em vista o elevado teor de cálcio presente sem suplementações deste micronutriente nas formulações.

Para os teores de potássio, não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações, os valores variaram de 90,61 a 95,29 mg/100 g. Estes resultados são inferiores

aos obtidos para bebidas lácteas comerciais, fermentadas por diferentes culturas de BAL, com teor de potássio de 145 mg/100 mL (KRAVIĆ et al., 2012). Isto porque o potássio é um mineral bastante abundante em lácteos (KRAVIĆ et al., 2012), e provavelmente encontra-se em menor proporção no grão-de-bico e coco utilizados na elaboração das formulações.

4.3. Caracterização das diferentes formulações de bebidas de grão-de-bico e coco durante armazenamento refrigerado

As diferentes formulações de bebida de grão-de-bico e coco foram armazenadas a 4 °C e analisadas ao longo de 10 dias quanto a viabilidade (log UFC/mL), pH, AT (g/100 g de ácido láctico), SST (°Brix) e quanto aos parâmetros de cor como tonalidade de cor (h*) e saturação de cor (C*).

Os valores médios de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 em formulações de bebida de grão-de-bico e coco estão representados nas Figuras 3 e 4, com equações de regressão descritas na Tabela 5.

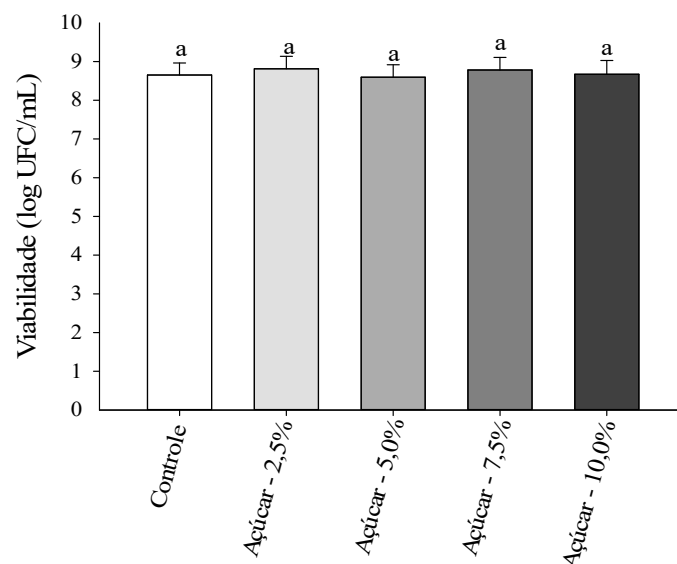


Figura 3. Viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 (log UFC/mL) nas diferentes formulações de bebida fermentada de grão-de-bico e coco elaboradas com diferentes teores de açúcar. Os valores médios de viabilidade (log UFC/mL) correspondem ao armazenamento das

formulações durante 10 dias a 4 °C. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

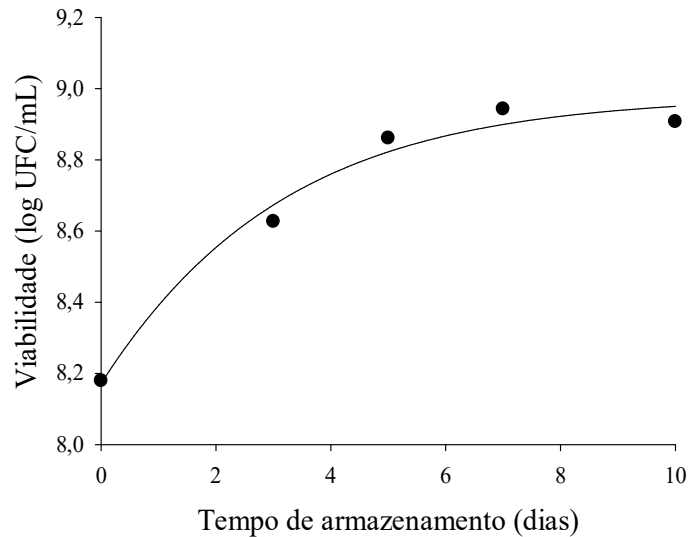


Figura 4. Valores médios de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 (log UFC/mL) nas formulações de bebidas fermentadas de grão-de-bico e coco durante o armazenamento de 10 dias a 4 °C. Os valores médios de viabilidade (log UFC/mL) são independentes do teor de açúcar utilizado

Tabela 5. Equações de regressão relacionadas a viabilidade (log UFC/mL) e pH das diferentes formulações de bebidas fermentadas de grão-de-bico e coco, e com diferentes teores de açúcar em função do tempo de armazenamento (x).

Variáveis	Equações Ajustadas	R ²	EPE
Viabilidade	$\hat{y} = \frac{8,979}{\left(1 + e^{\left(\frac{-(x+6,738)}{2,910}\right)}\right)}$	0,98	0,060
pH	$\hat{y} = 3,708 + \frac{1,780}{\left(1 + e^{\left(\frac{-(x-0,452)}{-2,337}\right)}\right)}$	0,99	0,014

EPE = Erro padrão da estimativa; n= três repetições.

Os valores médios relacionados a viabilidade do micro-organismo independente do período de estocagem foram superiores a 8,0 log UFC/mL, sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações (Figura 3). Demonstra-se que os teores de açúcar adicionados nas formulações não influenciaram na viabilidade do *L. paracasei* LBC 81 durante o período de estocagem a 4 °C. Entretanto, houve tendência de aumento da população de *L. paracasei* LBC 81, independentemente das formulações em função do tempo de armazenamento (Figura 4, Tabela 5). Possivelmente, durante o armazenamento refrigerado, os nutrientes contidos na bebida de grão-de-bico e coco foram utilizados para manter crescimento do micro-organismo.

Inicialmente, o valor médio estimado para viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 foi de 8,17 log UFC/mL e, no 10º dia, o valor médio estimado foi de 8,95 log UFC/mL (Figura 4). Ao comparar as formulações de bebidas de grão-de-bico e coco com outras bebidas vegetais, os resultados obtidos são semelhante ou superiores, como no estudo de Gokavi et al. (2005), que apresentou em bebida de aveia adicionada de açúcar e fermentada por cultura mista contendo *L. paracasei ssp. casei* B-29 semelhante viabilidade de 8,65 log UFC/mL no 10º dia de armazenamento. Mishra et al. (2019) apresentaram para iogurte de soja fermentado por *L. rhamnosus* K4E e *L. helveticus* K14 semelhante viabilidade de 8,68 log UFC/mL no 10º dia de armazenamento. Bernat et al. (2015) apresentaram em bebida de amêndoa adicionada de inulina e fermentada por cultura de mista, menor viabilidade para *L. reuteri* com 7,06 UFC/mL no 28º dia de armazenamento.

Além disso, é importante mencionar que os probióticos para exercerem efeitos benéficos para a saúde devem estar presentes em quantidades mínimas durante toda vida útil do produto (REZAC et al., 2018). Embora não haja um consenso universal, valores de 10^6 a 10^8 UFC são aceitos como satisfatórios (ŠERTOVIĆ et al., 2019). O *L. paracasei* LBC 81 é um potencial probiótico e apresentou contagens superiores ao mínimo exigido durante todo período de estocagem das diferentes formulações, demonstrando que as formulações de bebida de grão-de-bico e coco podem ser potenciais portadoras de BAL com potencial probiótico.

Outros parâmetros analisados (pH, AT e SST), que são medidas indiretas do crescimento microbiano, reforçam os resultados obtidos quanto à viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 nas diferentes formulações durante o período de estocagem. Para os valores médios de pH, observou-se tendência de decréscimo independentemente das formulações em função do tempo de estocagem (Figura 5 e Tabela 5). Em relação a AT, observou-se tendência de

aumento devido ao teor de açúcar e ao tempo de armazenamento (Figura 6A e Tabela 6). Quanto aos SST, a maior interação observada está relacionada aos teores de açúcar das formulações, com uma pequena variação ao longo do período de estocagem refrigerada (Figura 6B e Tabela 6).

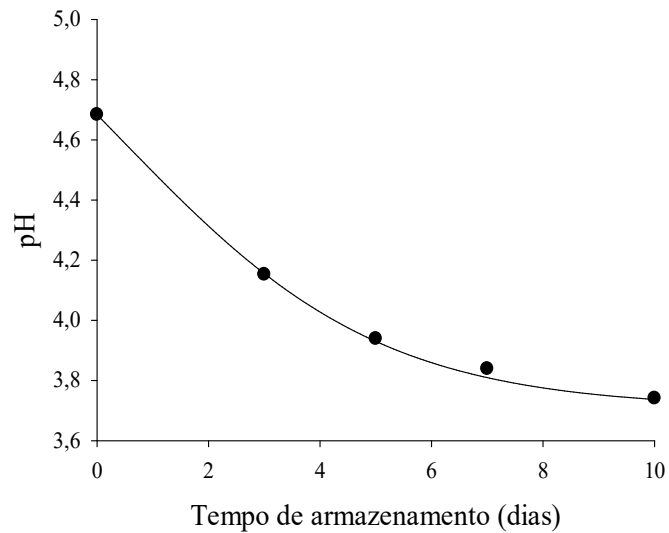


Figura 5. Valores médios de pH das diferentes formulações de bebida de grão-de-bico e coco fermentadas por *L. paracasei* LBC 81 durante 10 dias de armazenamento a 4 °C. Os valores médios de pH são independentes do teor de açúcar utilizado.

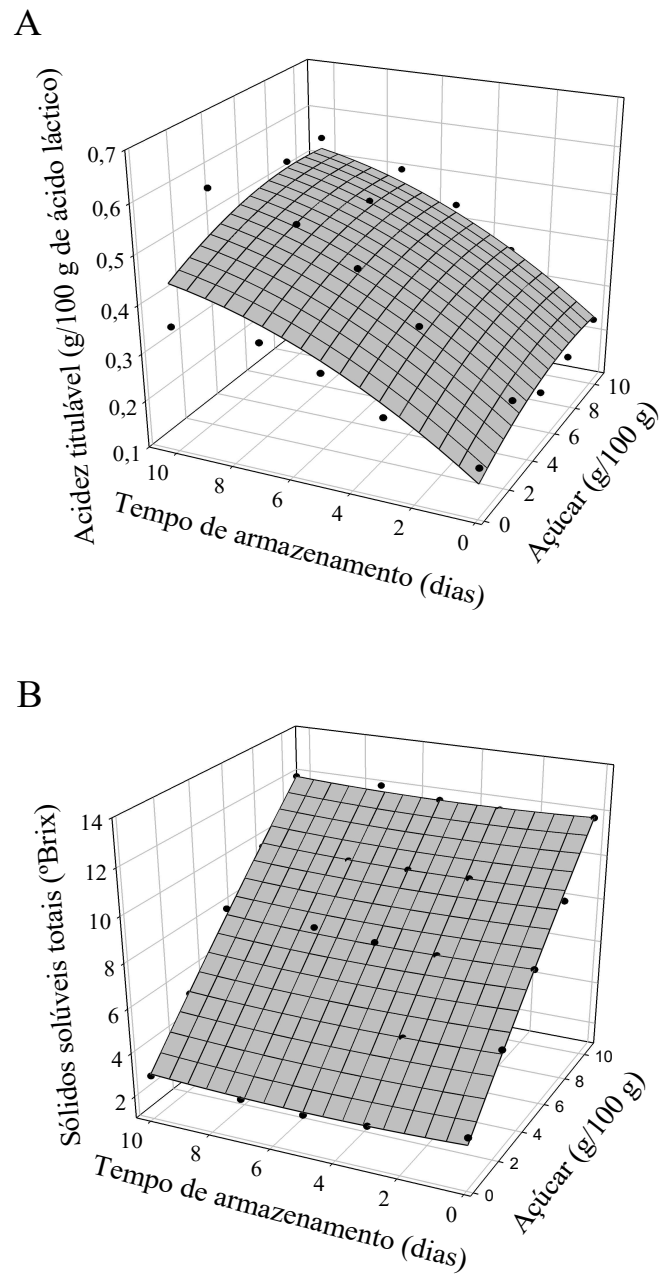


Figura 6. Acidez titulável em g/100 g de ácido láctico (AT) (A) e sólidos solúveis totais em °Brix (SST) (B) durante 10 dias de armazenamento a 4 ° C das formulações com diferentes teores de açúcar fermentadas por *L. paracasei* LBC 81.

Tabela 6. Equações de regressão relacionadas a acidez titulável (TA, g / 100 g de ácido láctico), sólidos solúveis totais (SST, °Brix), tonalidade de cor (h*) e saturação de cor (C*) das diferentes formulações de bebida de grão-de-bico e coco, em função do teor de açúcar (x) e do tempo de armazenamento (y).

Variáveis	Equações Ajustadas	R ²	EPE
TA	$\hat{z}=0,174+0,021x+0,045y-0,001x^2-0,002y^2$	0,81	0,053
SS	$\hat{z}=3,038+0,967x-0,067y-0,007x^2+0,007y^2$	0,99	0,189
h*	$\hat{z}=98,232+0,017x-0,490y+0,032x^2+0,047y^2$	0,67	1,057
C*	$\hat{z}=13,91-0,217x-0,116y$	0,75	0,535

EPE = Erro padrão da estimativa; n= três repetições.

No início do armazenamento, o valor médio estimado para pH foi de 4,68 e no 10º dia o valor médio estimado de pH decresceu para 3,74 (Figura 5). As formulações com maiores teores de açúcar resultaram em maior AT (Figura 6A). No 10º dia de armazenamento refrigerado, a formulação controle (sem açúcar) apresentou valor estimado para AT de 0,42 g/100 g de ácido láctico e a formulação com 10,0 % de açúcar valor estimado de 0,53g/100 g ácido láctico. O aumento da acidez, ao longo de estocagem refrigerada de produtos, também foi observado por outros autores para iogurtes e outras bebidas vegetais fermentadas. Mani-López, Palou, e López-Malo (2014) identificaram aumento da quantidade de ácido láctico em iogurte durante armazenamento a 5 °C por 35 dias. Casarotti et al. (2018) observaram aumento da acidez em bebidas de aveia e arroz fermentadas por *L. casei* Lc-1 e *S. thermophilus* TA040 durante estocagem refrigerada 4 °C por 28 dias.

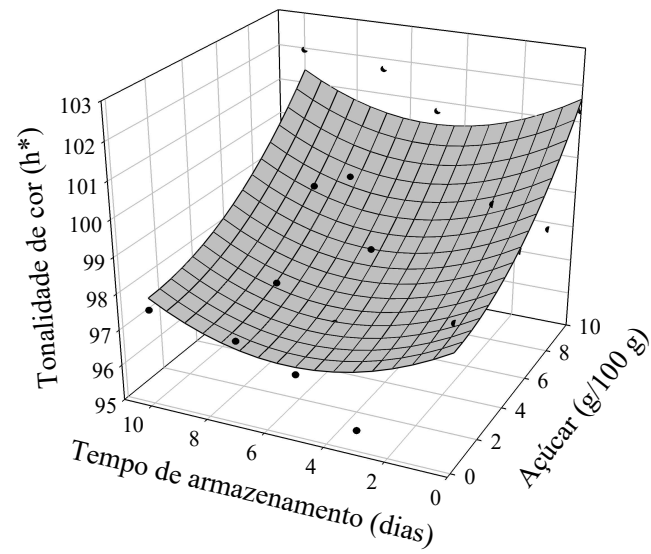
Embora a estirpe *L. paracasei* LBC 81 tenha permanecido em quantidade suficiente para proporcionar benefícios à saúde, as alterações sofridas em termos de pH e acidez são consideradas negativas, diante dos aspectos sensoriais. Em 10 dias de armazenamento, houve diminuição acentuada do pH e, proporcionalmente, aumento da AT. O aumento da acidez não é uma característica sensorial desejada, tendo em vista que consumidores tendem a rejeitar alimentos com maior acidez (MUHIALDIN et al. 2020). Vogado et al. (2018) obtiveram em leite fermentado suplementado com 9% de biomassa de banana acidez titulável de 0,61 g/100 g e baixa aceitação pelos provadores. Costa et al. (2017a) observaram maior aceitabilidade em relação ao sabor em bebida de soja e arroz fermentada com valor de pH em torno de 4,45. Portanto, a pós-acidificação ocorrida nas formulações ao longo dos 10 dias de armazenamento

refrigerado, apesar de não ter afetado a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81, poderia influenciar na aceitabilidade por consumidores.

Quanto ao teor de SST das formulações ao longo do armazenamento, foi observada certa estabilidade (Figura 6B). No início do armazenamento refrigerado, a formulação controle (sem açúcar) apresentou valor estimado de 3,04 °Brix e a formulação com 10,0 % de açúcar, valor estimado de 12,01 °Brix. No 10º dia os valores estimados foram de 3,07 e 12,04 °Brix, respectivamente. Ressalta-se que durante o período de estocagem refrigerada, o crescimento do micro-organismo ocorreu de forma mais lenta, o que possivelmente explica a estabilidade dos SST neste período. Resultados semelhantes foram obtidos por Torrico et al. (2020), que ao avaliarem iogurtes de morango fermentados por *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, obtiveram maior valor de °Brix para formulações com maior teor de açúcar, sendo que a adição de até 10% de sacarose não proporcionou alteração dos SST durante armazenamento a 4°C por 28 dias.

Ao analisar as variáveis relacionadas a cor como tonalidade de cor (h^*) e saturação de cor (C^*), houve variação significativa ($p < 0,05$) devido à interação entre teor de açúcar e tempo de armazenamento (Figura 7 e Tabela 6).

A



B

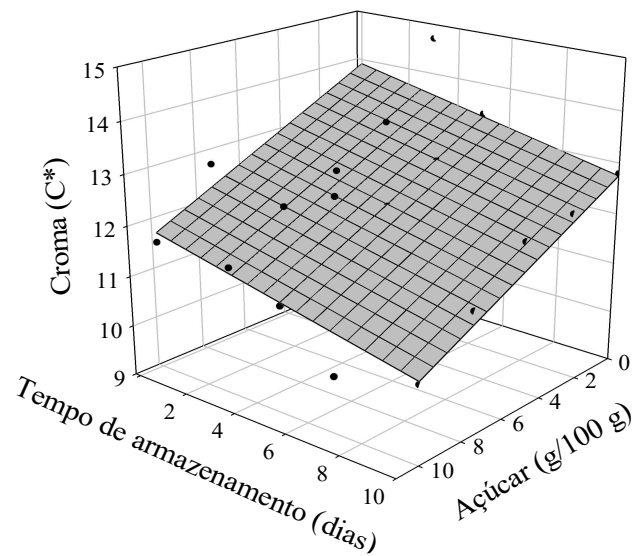


Figura 7. Tonalidade de cor (h^* , A) e cromia ou saturação de cor (C^* , B) durante 10 dias de armazenamento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ das diferentes formulações de bebida de grão-de-bico e coco elaboradas com diferentes teores de açúcar.

Para a tonalidade de cor (h^*) (Figura 7A), as formulações se mantiveram entre os ângulos de 90° a 180° , próximas da cor amarela, com algumas alterações durante o período de armazenamento. É possível observar tendência de decréscimo da tonalidade até o 4º dia de armazenamento refrigerado. Posteriormente, os valores aumentaram, de forma que no 10º dia apresentaram-se próximos aos obtidos no início do armazenamento. Maiores teores de açúcar

resultaram em maiores medidas de tonalidade de cor. Quanto à saturação de cor (C^*) (Figura 7B), foi possível observar tendência ao decréscimo até o 10º dia de armazenamento. Maiores teores de açúcar resultaram em menores medidas de saturação. Resultados parcialmente semelhantes foram obtidos por Pereira, Maciel e Rodrigues (2011), em suco de caju fermentado por *Lactobacillus casei* NRRL B-442, os pesquisadores identificaram redução da luminosidade e vermelhidão durante armazenamento a 4 °C por 42 dias. Costa et al. (2017a) identificaram o escurecimento de bebida de soja e arroz fermentada por *S. thermophilus*, *Bifidobacterium* spp BB-12 e *L. acidophilus* La-5, em armazenamento a 5 °C por 28 dias.

É importante ressaltar, que um dos principais fatores que explica as mudanças nos parâmetros de cor ao longo do armazenamento, pode estar relacionado a redução do pH por aumento do ácido láctico e pelo número de bactérias que atua como partícula de dispersão de luz modificando os parâmetros de cor (OWENS; BREWER; RANKIN, 2001). Assim, no presente estudo as mudanças relacionadas a cor provavelmente estão associadas ao aumento da acidez ocorrida durante o armazenamento refrigerado.

4.4. Sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em bebida fermentada de grão-de-bico e coco após exposição ao estresse gastrointestinal *in vitro*

A sobrevivência da estirpe *L. paracasei* LBC 81 na bebida de grão-de-bico e coco fermentada (BGCF) e nas suspensões de células em solução salina (SCSS) (controle 1) e em bebida de grão-de-bico e coco (SCGC) (controle 2), após exposição às condições de estresse gastrointestinal *in vitro*, está representada na Figura 8. Na digestão gástrica simulada, após exposição por 3h ao suco gástrico simulado de pH 2,0 (Figura 8 A), observou-se porcentagem de sobrevivência significativamente ($p < 0,05$) maior na BGCF com $99,47 \pm 2,05\%$, seguida pela SCGC e SCSS com $91,46 \pm 3,02\%$ e $48,73 \pm 1,15\%$, respectivamente. Diferentes fatores podem estar relacionados ao aumento da tolerância de *L. paracasei* LBC 81 na bebida fermentada, durante exposição ao suco gástrico simulado.

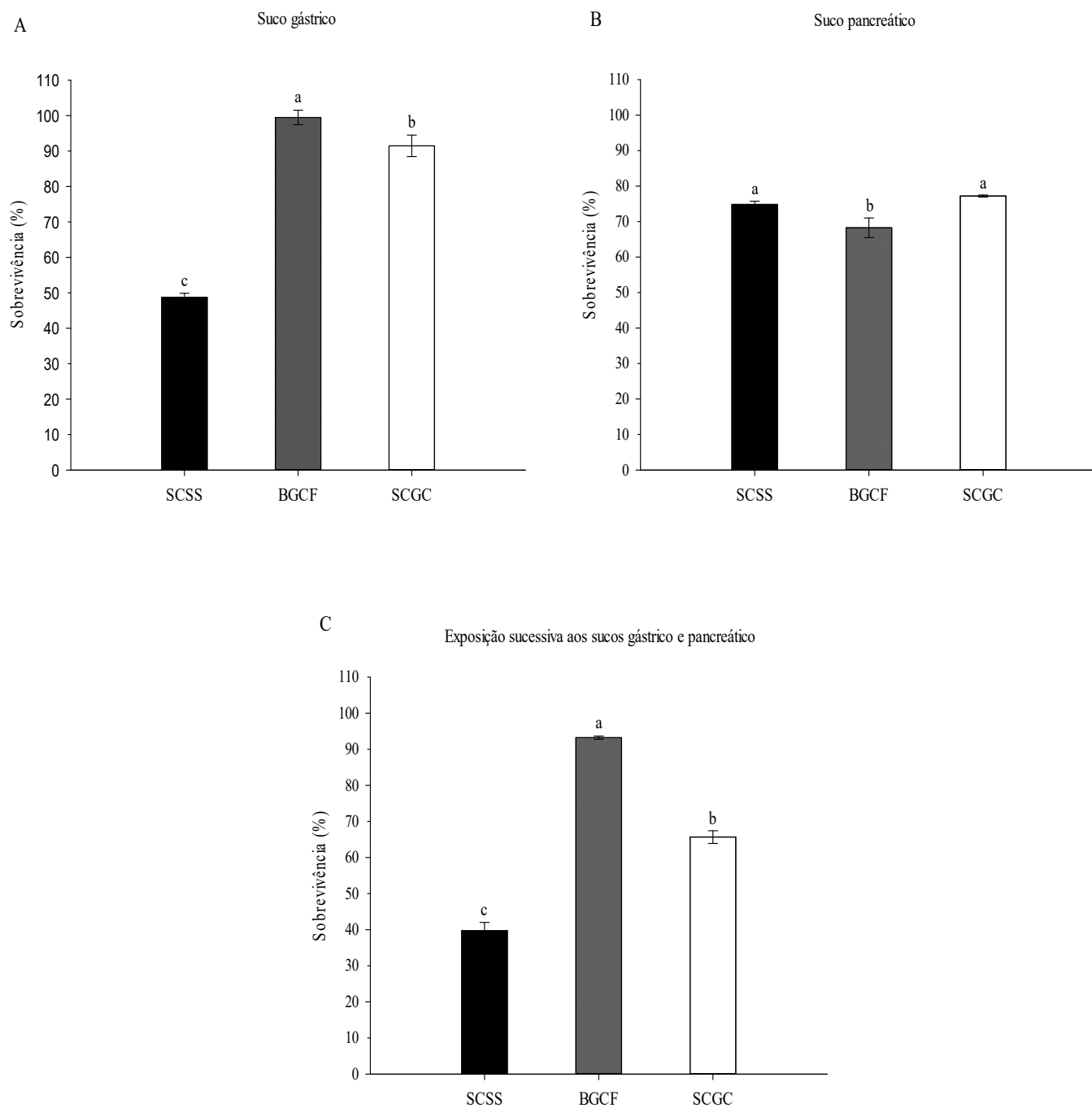


Figura 8. Porcentagem de sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em suspensão de células em solução salina (SCSS), bebida de grão-de-bico e coco fermentada (BGCF) e suspensão de células na bebida de coco e grão-de-bico (SCGB), após exposição ao suco gástrico simulado (A), suco pancreático simulado (B) e exposição aos sucos gástrico e pancreático em condições sucessivas (C). Letras minúsculas diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. n = três repetições.

Inicialmente para a BGCF, foi identificado menor valor de pH de $4,10 \pm 0,03$, enquanto para a SCSS e SCGB os valores de pH foram de $5,53 \pm 0,21$ e $5,20 \pm 0,19$, respectivamente. Isto pode explicar o maior percentual de sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 na BGCF. É possível que durante o processo de fermentação da bebida de grão-de-bico e coco, a estirpe *L. paracasei* LBC 81 tenha se adaptado às condições de baixo pH, o que possivelmente pode ter induzido a ativação de mecanismos de resistência diante da exposição ao suco gástrico simulado. Mecanismos como o sistema de arginina desiminase, que utiliza a arginina para produzir ATP, ornitina CO_2 e NH_3 ; bomba de prótons (F1-F0 – ATPase), que pode produzir ATP utilizando prótons ou bombeá-los para fora da célula através da hidrólise do ATP; descarboxilação de aminoácidos, em que na reação um próton é consumido e o produto é exportado da célula por meio de um transportador; e proteção e reparo de macromoléculas celulares (DNA, RNA e proteínas) estão presentes em estipes de BAL e foram associados a maior percentual de sobrevivência diante de condições de estresse ácido. Estes mecanismos resultam em regular o pH intracelular bacteriano e alcalizar o pH extracelular (VAN DE GUCHTE et al., 2002; ANGELIS; GOBBETTI, 2004; HILL et al., 2017; FIOCCO et al., 2020).

Outro fator que pode estar relacionado a maior sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em BGCF associa-se aos constituintes químicos dos ingredientes utilizados na elaboração da bebida. A sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em SCGB foi significativamente ($p < 0,05$) maior que em SCSS. Isto enfatiza o efeito do alimento como matriz protetora para o micro-organismo. O grão-de-bico é fonte de proteína, e o extrato de coco contém alto teor de lipídeo (RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN; 2015; SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016). Alguns estudos que utilizaram queijo como matriz reportam que a proteína e o alto teor de lipídeo presentes em alimentos podem conferir proteção adicional para BAL diante de exposições às condições gastrointestinais simuladas (ORTAKCI et al., 2012; PITINO et al., 2012). Além disso, o grão-de-bico contém aminoácidos livres, como a arginina (CORTÉS-GIRALDO, 2016). Possivelmente o *L. paracasei* LBC 81 tenha transportado a arginina para seu citoplasma, e assim, mecanismos como descarboxilação de aminoácidos e sistema de arginina desiminase possam ter protegido dos danos causados pela exposição ao meio ácido.

Os carboidratos são os constituintes em maior proporção no grão-de-bico (50-70%), formados principalmente por oligossacarídeos e polissacarídeos (HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017). Estes componentes podem atuar como barreiras físicas, protegendo o micro-organismo da exposição ao suco gástrico. Li et al. (2019) relataram que

oligossacarídeos de amora proporcionaram efeito protetor para o *L. rhamnosus*, durante digestão gástrica simulada. Kocer e Unal (2018) observaram que a adição de inulina ao leite fermentado aumentou a sobrevivência de *L. acidophilus* após a exposição ao suco gástrico simulado, isto porque a inulina contém pequenos agregados que podem atuar como uma barreira física. Ainda, os polissacarídeos extracelulares (PSE) produzidos por BAL tem um importante papel na proteção microbiana (BENGOA et al., 2018). Boke, Aslim e Alp (2010) relataram que estirpes de BAL, isoladas de iogurte, com maior produção de PSE obtiveram maior sobrevivência após exposição a solução de pH 2,0.

Alguns estudos demonstram que as bactérias probióticas não inseridas em alimentos apresentam alta redução da sobrevivência após exposição ao suco gástrico simulado. Segundo Bedani, Rossi e Saad (2013), ao comparar a sobrevivência de *B. animalis* Bb-12 como cultura pura e em iogurte de soja após exposição a condições gástricas, observaram que a presença da matriz aumentou a sobrevivência da estirpe. Costa et al. (2017b) observaram que a presença de sorvete de açaí simbiótico atuou como matriz protetora na sobrevivência de *L. rhamnosus* GG, após condições gástricas simuladas. Certamente a matriz alimentar oferece proteção atuando como barreira física para o micro-organismo diante das condições adversas do TGI.

Quanto a digestão pancreática simulada, após exposição por 4h ao suco pancreático simulado de pH 8,0 (Figura 8 B), a BGCF apresentou porcentagem de sobrevivência para o *L. paracasei* LBC 81 de $68,26 \pm 2,77\%$. Essa porcentagem foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que a obtida nas SCSS e SCGB com $74,83 \pm 0,91\%$ e $77,21 \pm 0,28\%$, respectivamente. É possível que o pH da bebida fermentada ($4,10 \pm 0,03$) tenha interferido na sensibilidade da estirpe diante da exposição ao suco pancreático, tendo em vista que a suspensões celulares apresentaram pH inicialmente superior e obtiveram maior sobrevivência para *L. paracasei* LBC 81 após exposição ao suco pancreático simulado. Ainda, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a porcentagem de sobrevivência em SCSS e SCGB. Isto sugere que a presença do alimento não foi um fator para proteção do *L. paracasei* LBC 81, diante da exposição ao suco pancreático simulado.

Os sais biliares são um dos componentes do suco pancreático que mais afetam a viabilidade do micro-organismo (ANGELIS; GOBETTI, 2004). Alguns estudos demonstram maior sensibilidade de BAL inseridas em alimentos, após exposição ao suco pancreático simulado. Valero-Cases e Frutos (2017) observaram menor sobrevivência do *L. plantarum* CECT 220 em suco de cenoura e laranja fermentado, após 60 minutos de

exposição ao suco pancreático. Albuquerque et al. (2019) observaram sensibilidade de *L. rhamnosus* LGG em bebida de soja fermentada adicionada de frutooligossacarídeo, após 4h de exposição ao suco pancreático. Essa sensibilidade do micro-organismo se deve aos sais biliares, que podem afetar os fosfolipídios e proteínas da membrana bacteriana, bem como a homeostase celular e a estabilidade das macromoléculas (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005).

Além disso, é possível observar que durante exposição ao suco pancreático, mesmo que a bebida de grão-de-bico e coco não tenha proporcionado efeito protetor para *L. paracasei* LBC 81, verifica-se viabilidade do micro-organismo em todos os tratamentos. O que sugere que o *L. paracasei* LBC 81 tenha tolerância intrínseca ao suco pancreático, visto que, a SCSS apresentou maior sobrevivência após exposição ao suco pancreático simulado (Figura 8 B) que ao suco gástrico simulado (Figura 8 A). Begley, Gahan e Hill (2005) mencionam que algumas BAL apresentam enzimas que hidrolisam os sais biliares (BSH), consequentemente diminuindo a ação de toxicidade para as bactérias probióticas.

Diante das condições de exposição aos sucos gástrico e pancreático de forma sucessiva (Figura 8 C), a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em BGCF foi de $93,21 \pm 0,43\%$. Essa porcentagem foi significativamente ($p < 0,05$) maior quando comparado às SCSS e SCGB, com $39,73 \pm 2,30\%$ e $65,67 \pm 1,75\%$, respectivamente. Provavelmente, a maior sobrevivência do micro-organismo em BGCF esteja relacionada a adaptação de *L. paracasei* LBC 81 em meio ácido. Os mecanismos citados anteriormente, após exposição ao suco gástrico isoladamente, podem estar envolvidos nesse processo, o que conferiu maior resistência a *L. paracasei* LBC 81 durante exposição ao suco pancreático simulado. Segundo Begley, Gahan e Hill (2005), a própria adaptação em meio ácido altera a permeabilidade da membrana celular, tornando a bactéria mais resistente aos efeitos nocivos dos sais biliares. Picard et al. (2005) mencionaram que a enzima BSH presente em algumas bactérias, na qual hidrolisa os sais biliares, pode ser ativada durante a passagem pelo TGI. Possivelmente, essa enzima foi ativada durante exposição ao suco gástrico, influenciando positivamente a resistência do *L. paracasei* LBC 81 durante exposição ao suco pancreático.

É importante ressaltar que durante exposição aos sucos gástrico e pancreático de forma sucessiva, a bebida de grão-de-bico e coco proporcionou efeito protetor para *L. paracasei* LBC 81, visto que, a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em SCGC foi significativamente ($p < 0,05$) maior que em SCSS. Entretanto, com os achados obtidos após exposição ao suco pancreático isoladamente, não foi possível observar o efeito protetor da bebida de grão-de-

bico e coco. Tal fato confirma novamente que a ação de proteção da bebida de grão-de-bico e coco, quanto ao *L. paracasei* LBC 81 está associada a exposição prévia em meio ácido.

Ainda, a BGCF e SCSS foram armazenadas a 4 °C, e a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81, após exposição as condições gastrointestinais simuladas foi avaliada com 1 e 8 dias de armazenamento refrigerado das bebidas (Tabela 7).

Tabela 7. Sobrevivência (%) de *L. paracasei* LBC 81 durante armazenamento refrigerado a 4 °C de FCCB e CSCCB, após condições gastrointestinais simuladas.

Tempo (dias)	Tratamentos	
	*BGCF	**SCGC
	Suco gástrico	
1	99,47±2,05aA	91,46±3,02bB
8	100,11±1,45aA	99,05±0,61aA
	Suco pancreático	
1	68,26±2,77aB	77,21±0,28aA
8	72,19±7,86aA	52,42±4,38bB
	Exposição sucessiva aos sucos gástrico e pancreático	
1	93,21±0,43aA	65,67±1,75bB
8	96,31±3,47aA	86,89±0,68aB

*BGCF= Bebida de grão-de-bico e coco fermentada; **SCGB= suspensão de células em bebida de coco e grão-de-bico. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. n= três repetições.

A porcentagem de sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em BGCF não foi afetada ao longo do armazenamento. Observa-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$), diante da exposição ao suco gástrico e suco pancreático isoladamente, e de forma sucessiva, com 1 e 8 dias de armazenamento. O pH em BGCF decresceu ao longo do armazenamento refrigerado, passando de $4,10 \pm 0,03$ no 1º dia, para $3,10 \pm 0,10$ no 8º dia de armazenamento. A pós-acidificação ocorrida não foi um fator influenciador na viabilidade do *L. paracasei* LBC 81, tendo em vista que a sobrevivência desta estirpe não foi comprometida ao longo do armazenamento a 4 °C.

Entretanto, ao analisar a SCGC, diante da exposição ao suco gástrico e suco pancreático isoladamente, e de forma sucessiva, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) com 1 e 8 dias de armazenamento. No 1º dia de armazenamento refrigerado, o pH em SCGC foi de $5,53 \pm 0,21$ e no 8º dia decresceu para $4,06 \pm 0,04$. É provável que a redução do pH ao longo do armazenamento tenha influenciado na sobrevivência do *L. paracasei* LBC 81. Diante da exposição ao suco gástrico simulado, *L. paracasei* LBC 81 mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) da porcentagem de sobrevivência no 8º dia de armazenamento em SCGC. Comportamento semelhante foi obtido diante da exposição aos sucos gástrico e pancreático de forma sucessiva. Somente após a exposição ao suco pancreático isoladamente, o micro-organismo se apresentou mais sensível no 8º dia de armazenamento em SCGC.

É importante ressaltar que o *L. paracasei* LBC 81 tenha se adaptado as condições de baixo pH dos tratamentos, o que possivelmente favoreceu a indução de mecanismos de resistência diante da exposição ao suco gástrico simulado, e maior sensibilidade diante da exposição ao suco pancreático isoladamente, como mencionado anteriormente. Em BGCF, essa adaptação pode ter ocorrido durante prévia redução de pH no processo de fermentação. Assim ao longo do armazenamento, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a sobrevivência de *L. paracasei*, após exposição as condições gastrointestinais simuladas. Em SCGC, a redução de pH ocorreu somente ao longo do armazenamento, possivelmente proporcionando a adaptação do micro-organismo em meio ácido, o que consequentemente explica as diferenças significativas ($p < 0,05$) após exposição as condições gastrointestinais simuladas.

Certamente, os resultados de sobrevivência de micro-organismos vão depender da estirpe e da matriz utilizada (MANTOVANI et al., 2020). Alguns estudos demonstram que a sobrevivência de BAL em outras matrizes, após condições gastrointestinais pode ser afetada ou não durante armazenamento refrigerado. No estudo de Bedani et al. (2013), as estirpes de *L. acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12, adicionadas em iogurte de soja, não foram afetadas pelo armazenamento refrigerado a 4 °C por 28 dias, após exposição a condições gastrointestinais. Entretanto, Saito et al. (2014) observaram que as estirpes *L. fermentum* TcUESC01 e *L. plantarum* TcUESC02 inseridas em iogurtes de soja, foram afetadas por condições gastrointestinais adversas, durante armazenamento a 5 °C por 27 dias. Wang et al (2009a) observaram menor resistência para o *L. casei* Zhang, quando incorporado em leite fermentado, com 28 dias de armazenamento a 4 °C, após exposição gástrica simulada em pH

2,5, do que quando incorporado em bebida de soja fermentada, diante das mesmas condições mencionadas.

De fato, o pH e/ou a exposição prévia, em meio ácido pode influenciar na sobrevivência de micro-organismos. Segundo Champagne e Gardner (2008), uma exposição por um curto período, de BAL em meio ácido a 37 ° C, pode proporcionar melhor proteção às condições adversas do TGI, do que um longo período de armazenamento sob baixas temperaturas. De forma geral, quanto ao período de armazenamento, a BGCF (incubada a 37 °C/6 h) apresentou as maiores porcentagens de sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81, após exposição ao suco gástrico e sucos gástrico e pancreático de forma sucessiva. Logo a SCGC, após redução do pH com 8 dias de armazenamento, mostrou comportamento fisiológico semelhante a bebida fermentada armazenada sob 1 dia de refrigeração.

CONCLUSÃO

A bebida de grão-de-bico e coco demonstrou ser uma excelente matriz para o crescimento da estirpe *L. paracasei* LBC 81. Os teores de açúcar adicionados à bebida otimizaram o período de fermentação, por reduzir o tempo de finalização do processo fermentativo, no entanto este açúcar não foi um fator determinante para que ocorresse o crescimento microbiano. Após fermentação, as formulações não apresentaram diferenças significativas para os valores de proteína e lipídeo, porém os maiores teores de açúcar resultaram em aumento da quantidade de carboidrato e valor energético. A viabilidade de *L. paracasei* LBC 81, nas diferentes formulações durante armazenamento refrigerado a 4 °C por 10 dias, apresentou contagem acima do mínimo recomendado. Entretanto, foi verificado mudanças nos parâmetros de tonalidade e saturação de cor nesse período, além de uma intensa pós-acidificação, o que sugere um período menor que 10 dias de armazenamento para as formulações fermentadas de bebida de grão-de-bico e coco.

Diante da exposição ao estresse gastrointestinal *in vitro*, foi verificado que o processo de fermentação da bebida de grão-de-bico e coco resultou em maior proteção da estirpe *L. paracasei* LBC 81 após exposição ao suco gástrico simulado, e sucos gástrico e pancreático em condições sucessivas, destacando o efeito protetor da matriz. O que conseqüentemente, pode garantir que um maior número de células viáveis atinja o epitélio intestinal. Diante da exposição ao suco pancreático simulado isoladamente, foi verificado uma possível tolerância intrínseca do micro-organismo ao meio. O armazenamento da bebida fermentada de grão-de-bico e coco a 4 °C por 8 dias não afetou a sobrevivência da estirpe *L. paracasei* LBC 81 após a exposição as condições de estresse simuladas.

Assim, diante dos dados obtidos no presente estudo é possível sugerir que a bebida fermentada de grão-de-bico e coco independente do teor de açúcar, sob armazenamento refrigerado por menos de 10 dias, pode ser uma nova alternativa ao consumo de leites fermentados, principalmente para veganos e por pessoas com intolerância à lactose ou alergia à proteína do leite. Estudos futuros que avaliem a aceitabilidade da bebida fermentada de grão-de-bico e coco, bem como, os benefícios ocasionados pelo seu consumo devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- AKBABA, U.; ŞAHIN, Y.; TÜRKEZ, H. The element contents in chickpeas grown under organic and conventional farming regimes using WDXRF analysis for human nutrition and health. **Turkish Journal of Physics**, v. 36, n. 2, p. 279–287, 2012.
- ALSAFFAR, A. A. Sustainable diets: The interaction between food industry, nutrition, health and the environment. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 2, p. 102–111, 2016.
- ALBUQUERQUE, M. A. C. et al. Influence of passion fruit by-product and fructooligosaccharides on the viability of *Streptococcus thermophilus* TH-4 and *Lactobacillus rhamnosus* LGG in folate bio-enriched fermented soy products and their effect on probiotic survival and folate bio-access. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, n. July 2018, p. 126–136, 2019.
- AMRITHA, G. K.; VENKATESWARAN, G. Use of *Lactobacilli* in cereal-legume fermentation and as potential probiotics towards phytate hydrolysis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 647–653, 2018.
- ANGELINO, D. et al. Nutritional quality of plant-based drinks sold in Italy: The Food Labelling of Italian Products (FLIP) study. **Foods**, v. 9, n. 5, 2020.
- ANGELIS, M. DE; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: Review. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 106–122, 2004.
- ANGELOV, A.; YANEVA-MARINOVA, T.; GOTCHEVA, V. Oats as a matrix of choice for developing fermented functional beverages. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 7, p. 2351–2360, 2018.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999: Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde em sua Rotulagem. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388845/RESOLUCAO_19_1999.pdf/99351bc5-99b1-49a8-a1fd-540b4096db22>. Acesso em julho 2020

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. IX Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas. Julho, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em maio de 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Probióticos: Construção da lista de linhagens probióticas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/An%C3%A1lise+das+Linhagens+de+Probi%C3%B3ticos__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95>. Acesso em maio de 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC Nº 241 de 26 de julho de 2018: Regulamento técnico dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em junho de 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Probióticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13>>. Acesso em abril de 2019.

ARVANITOYANNIS, I. S.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. Functional foods: A survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 5, p. 385–404, 2005.

ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9987–10013, 2017.

ASHAOLU, T. J. Safety and quality of bacterially fermented functional foods and beverages: a mini review. **Food Quality and Safety**, p. 1–5, 2020.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the AOAC. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA. 2005.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. AOCS. Approved procedure am 5-04 rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. 2005. Disponível

em: <<http://www.academia.edu/30938058/AOCS>> Acesso em 25 março de 2020.

BAKER, M. G.; KATTAN, J. D. Review of 400 consecutive oral food challenges to almond. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 122, n. 2, p. 189–192, 2019.

BAKSHI, A.; CHHABRA, S.; KAUR, R. Consumers' Attitudes Toward Functional Foods: A Review. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 18, n. 4, p. 343–347, 2020.

BARCELLOS, M. D. DE; LIONELLO, R. L. Consumer Market for Functional Foods in South Brazil. **International Journal Food System Dynamics**, v. 2, n. 2, p. 126–144, 2011.

BAUTISTA-GALLEGO, J. et al. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International** v. 50, n. 1, p. 135–142, 2013.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 382–389, 2013.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625–651, 2005.

BEHERA, S. S.; PANDA, S. K. Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 29–36, 2020.

BELL, E. A. Nonprotein amino acids of plants: Significance in medicine, nutrition, and agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2854–2865, 2003.

BENGOA, A. A. et al. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. **Food Microbiology**, v. 69, p. 212–218, 2018.

BENGOA, A. A. et al. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 686–700, 2019a.

BENGOA, A. A. et al. “Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir”. **Food Research International**, v. 123, p. 48–55, 2019b.

BERNAT, N. et al. 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, 2013.

BERNAT, N. et al. Development of a non-dairy probiotic fermented product based on almond milk and inulin. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 6, p. 440–453, 2015.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 118–129, 2013.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 665–684, 2018.

BLAIOTTAA, G. et al. Production of probiotic bovine salami using *Lactobacillus plantarum* 299v as adjunct. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 6, p. 2285–2294, 2018.

BOKE, H.; ASLIM, B.; ALP, G. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSs) produced by yogurt starter bacteria. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 2, p. 323–328, 2010.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2–3, p. 121–129, 2010.

CABANILLAS, B.; JAPPE, U.; NOVAK, N. Allergy to Peanut, Soybean, and Other Legumes: Recent Advances in Allergen Characterization, Stability to Processing and IgE Cross-Reactivity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 62, n. 1, p. 1–9, 2018.

CASAROTTI, S. N. et al. Guava, orange and passion fruit by-products: Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, n. July, p. 69–76, 2018.

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.

CHEN, X. et al. Yogurt Fortification with Chickpea (*Cicer arietinum*) Flour: Physicochemical and Sensory Effects. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8,

p. 1041–1048, 2018.

CHIANG, S. S.; PAN, T. M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 903–916, 2012.

CLEGHORN, C. et al. Estimating the health benefits and cost-savings of a cap on the size of single serve sugar-sweetened beverages. **Preventive Medicine**, v. 120, n. December 2018, p. 150–156, 2019.

COLOMBO, M. et al. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 4, p. 487–496, 2018.

CORTÉS-GIRALDO, I. et al. Purification of free arginine from chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. **Food Chemistry**, v. 192, p. 114–118, 2016.

COSTA, K. K. F. D. et al. Changes of probiotic fermented drink obtained from soy and rice byproducts during cold storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 78, p. 23–30, 2017a.

COSTA, M. G. M. et al. Synbiotic Amazonian palm berry (açai, *Euterpe oleracea* Mart.) ice cream improved *Lactobacillus rhamnosus* GG survival to simulated gastrointestinal stress. **Food and Function**, v. 8, n. 2, p. 731–740, 2017b.

DAVOODI, S. et al. Influence of sucrose, glucose, stevia leaf and stevioside on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*. **Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science**, v. 40, n. 4, p. 275–279, 2016.

DÍAZ, L. D.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1738–1746, 2020.

DI CERBO, A.; PALMIERI, B. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* f19; A farmacogenomic and clinical update. **Nutricion Hospitalaria**, v. 28, n. 6, p. 1842–1850, 2013.

DIDARI, T. et al. A systematic review of the safety of probiotics. **Expert Opinion on Drug**

Safety, v. 13, n. 2, p. 227–239, 2014.

DINIZ-SILVA, H. T. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Escherichia coli* O157:H7 in Minas frescal cheese made with oregano and rosemary essential oils. **Food Microbiology**, p. 103348, 2019.

DOUILLARD, F. P.; DE VOS, W. M. Biotechnology of health-promoting bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107369, 2019.

EMBRAPA. Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças. Cultivo do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Brasília, DF, 1998. p. 1-12.

ERBA, D. et al. Effect of sprouting on nutritional quality of pulses. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 30–40, 2019.

FACCIN, G. L. et al. Chemical, Sensorial and Rheological Properties of a New Organic Rice Bran Beverage. **Rice Science**, v. 16, n. 3, p. 226–234, 2009.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group. FAO, Rome, Italy, and WHO, Geneva, Switzerland. 2002.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food loss analysis: causes and solutions. Chickpean supply chain in India. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/BU689EN/bu689en.pdf>>. Acesso em março 2020.

FARIDY, J. C. M. et al. Biological Activities of Chickpea in Human Health (*Cicer arietinum* L.). A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 142–153, 2020.

FELICIO, T. L. et al. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. **Food Chemistry**, v. 196, p. 628–637, 2016

FERRAZ, J. L. et al. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

FILHO, A. L. DOS S. et al. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, n.

July 2018, p. 371–378, 2019.

FIOCCO, D. et al. How probiotics face food stress: They get by with a little help. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1552–1580, 2020.

FRANCIS, F.J. THE ORIGIN OF \tan^{-1} a/b. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 412–412, 1975.

FRIEDMAN, M. Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 11, 2018.

FU, Y. H.; ZHANG, F. C. Changes in isoflavone glucoside and aglycone contents of chickpea yoghurt during fermentation by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 5, p. 744–750, 2013

FURTADO, L. L. et al. Viability of probiotic bacteria in tropical mango juice and the resistance of the strains to gastrointestinal conditions simulated in vitro. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 40, n. 1, p. 149–162, 2019.

GAO, Z. et al. Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 3, p. 441–453, 2019.

GARCÍA, C.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 119, p. 207–220, 2019.

GAWKOWSKI, D.; CHIKINDAS, M. L. Non-dairy probiotic beverages: The next step into human health. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 2, p. 127–142, 2013.

GIRI, S. S. et al. Use of a Potential Probiotic , *Lactobacillus casei* L4 , in the Preparation of Fermented Coconut Water Beverage. v. 9, n. August, p. 1–9, 2018.

GOKAVI, S. et al. M: Food Microbiology and Safety Oat-based Symbiotic Beverage Fermented by *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus paracasei* ssp. *casei* , and *Lactobacillus acidophilus*. **Food Microbiology and Safety Oat-based**, v. 70, n. 4, p. 216–223, 2005.

GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2617–

2627, 2016.

HALL, C.; HILLEN, C.; ROBINSON, J. G. Composition, Nutritional Value and Health Benefits of Pulses. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 11–31, 2017.

HILL, D. et al. The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–12, 2017.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253–260, 2004.

HUSSEIN, H. et al. Impact of chickpea as prebiotic, antioxidant and thickener agent of stirred bio-yoghurt. **Annals of Agricultural Sciences**, n. October 2019, p. 0–1, 2020.

HWANG, J. et al. Determination of sodium contents in traditional fermented foods in Korea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 56, p. 110–114, 2017.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

IORIO, M. C. et al. A case study on the use of ultrasound for the inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in almond milk. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 52, n. October, p. 477–483, 2019.

JESKE, S.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Evaluation of Physicochemical and Glycaemic Properties of Commercial Plant-Based Milk Substitutes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 26–33, 2017.

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**, v. 110, p. 42–51, 2018.

KANTACHOTE, D. et al. The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 401–408, 2017.

KARACA, O. B.; SAYDAM, İ. B.; GÜVEN, M. Physical, chemical, and sensory attributes of low-fat, full-fat, and fat-free probiotic set yogurts fortified with fiber-rich persimmon and

apple powders. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 6, p. 1–13, 2019.

KOCER, E.; UNAL, G. Effects of different prebiotics on viability under in vitro gastrointestinal conditions and sensory properties of fermented milk. **Italian Journal of Food Science**, v. 30, n. 3, p. 568–582, 2018.

KOWALESKI, J. et al. Functional yogurt with strawberries and chia seeds. **Food Bioscience**, v. August, p. 100726, 2020.

KRAVIĆ, S. Ž. et al. Direct determination of calcium, sodium and potassium in fermented milk products. **Acta Periodica Technologica**, v. 43, p. 43–49, 2012.

LEE, A. et al. Consumption of dairy yogurt containing *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* and Heat-Treated *Lactobacillus plantarum* improves immune function including natural killer cell activity. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017.

LI, E. et al. In-vitro digestion by simulated gastrointestinal juices of *Lactobacillus rhamnosus* cultured with mulberry oligosaccharides and subsequent fermentation with human fecal inocula. **LWT - Food Science and Technology**, v. 101, p.61–68, 2019

LIGOR, M. et al. Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. **Electrophoresis**, v. 39, n. 15, p. 1860–1874, 2018.

MAHAN, K. L.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 11ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 1242.

MÄKINEN, O. E. et al. Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 339–349, 2016.

MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2578–2590, 2014.

MANTOVANI, F. D. et al. Is there an impact of the dairy matrix on the survival of *Lactobacillus casei* Lc-1 during shelf life and simulated gastrointestinal conditions? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 1, p. 32–37, 2020.

MANTZOURANI, I. et al. Production of a potentially synbiotic fermented Cornelian cherry

- (*Cornus mas* L.) beverage using *Lactobacillus paracasei* K5 immobilized on wheat bran. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. November, p. 347–351, 2019.
- MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 2016.
- MARGIER, M. et al. Nutritional composition and bioactive content of legumes: Characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the cooking method. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2018.
- MAURO, C. S. I.; GARCIA, S. Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 854–864, 2019.
- MCLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME, R. W. Hue angle determinations and statistical analysis for multi-quadrant hunter L,a,b data. **Journal of Food Quality**, v. 18, p. 235–240; 1995.
- MENEZES, A. G. T. et al. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187–197, 2018.
- MIN, M. et al. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2626–2641, 2018.
- MISHRA, B. K. et al. Biofunctional attributes and storage study of soy milk fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus helveticus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 399–407, 2019.
- MUHIALDIN, B. J. et al. Effects of metabolite changes during lacto-fermentation on the biological activity and consumer acceptability for dragon fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 121, n. December 2019, p. 108992, 2020.
- NAZZARO, F. et al. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 280–285, 2012.
- NOCERINO, R. et al. Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, v.

36, n. 1, p. 118–125, 2017.

NOGUEIRA, J. C. R. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487–492, 2011.

NORBERTO, A. P. et al. Impact of partial and total replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, n. March, p. 491–498, 2018.

ONECA, M. et al. Proteolytic activity of some *Lactobacillus paracasei* strains in a model ovine-milk curd system: Determination of free amino acids by RP-HPLC. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1602–1610, 2007.

ORTAKCI, F. et al. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6274–6281, 2012.

OWENS, S. L.; BREWER, J. L.; RANKIN, S. A. Influence of Bacterial Cell Population and pH on the Color of Nonfat Milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 34, n. 5, p. 329–333, 2001.

PADILHA, V. M. et al. Optimization of synbiotic yogurts with yacon pulp (*Smallanthus sonchifolius*) and assessment of the viability of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 166–175, 2017.

PATIL, U. et al. A comparative study of the physicochemical properties and emulsion stability of coconut milk at different maturity stages. **Italian Journal of Food Science**, v. 29, n. 1, p. 145–157, 2017.

PATIL, U.; BENJAKUL, S. Coconut Milk and Coconut Oil: Their Manufacture Associated with Protein Functionality. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 8, p. 2019–2027, 2018.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 2011.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2060–2076, 2018.

PICARD, C. et al. Review article: *Bifidobacteria* as probiotic agents - Physiological effects

and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 495–512, 2005.

PIMENTEL, T. C. et al. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 2015.

PINELI, L. L. O. et al. Low glycemic index and increased protein content in a novel quinoa milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1261–1267, 2015.

PITINO, I. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiol**, v.31, p. 57–63, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.013>

PLAZA-DIAZ, J. et al. Mechanisms of Action of Probiotics. **Advances in nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 10, n. 1, p. S49–S66, 2019.

RACHWA-ROSIK, D.; NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Chickpeas—Composition, Nutritional Value, Health Benefits, Application to Bread and Snacks: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 1135–1143, 2015.

RATHORE, S.; SALMERÓN, I.; PANDIELLA, S. S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 239–244, 2012.

REALE, A. et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 721–728, 2015.

REZAC, S. et al. Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, 2018.

RINCON, L.; BOTELHO, R. B. A.; DE ALENCAR, E. R. Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, n. April, p. 109479, 2020.

RIZZOLI, R.; BIVER, E. Effects of Fermented Milk Products on Bone. **Calcified Tissue International**, v. 102, n. 4, p. 489–500, 2018.

- RODRIGUES, S. et al. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603–611, 2017.
- ROGGERO, P. et al. Analysis of immune, microbiota and metabolome maturation in infants in a clinical trial of *Lactobacillus paracasei* CBA L74-fermented formula. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.
- ROSELINO, M. N. et al. Effect of fermented sausages with probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 on gut microbiota using dynamic colonic model. **Lwt**, v. 132, n. January, 2020.
- SAADAT, Y. R.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; GARGARI, B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, n. April, p. 79–89, 2019.
- SAITO, V. S. T. et al. Viability and resistance of *Lactobacilli* isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, 2014.
- SANTINI, M. S. S. et al. Dried Tomato-Flavored Probiotic Cream Cheese with *Lactobacillus paracasei*. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 11, p. 604–608, 2012.
- SAUER, M. et al. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 756–769, 2017.
- SENGUN, I. Y. et al. The viability of *Lactobacillus rhamnosus* in orange juice fortified with nettle (*Urtica dioica* L.) and bioactive properties of the juice during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, p. 108707, 2020.
- SERRANO-SANDOVAL, S. N.; GUARDADO-FÉLIX, D.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Changes in digestibility of proteins from chickpeas (*Cicer arietinum* L.) germinated in presence of selenium and antioxidant capacity of hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 285, n. January, p. 290–295, 2019.
- ŠERTOVIĆ, E. et al. Physical, Chemical, Microbiological and Sensory Characteristics of a Probiotic Beverage Produced from Different Mixture of Cow's Milk and Soy Beverage by *Lactobacillus acidophilus* La5 and Yogurt Culture. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 4, 2019.

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.

SEVES, S. M. et al. Are more environmentally sustainable diets with less meat and dairy nutritionally adequate? **Public Health Nutrition**, v. 20, n. 11, p. 2050–2062, 2017.

SHOKRYAZDAN, P. et al. Probiotics: From Isolation to Application. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 666–676, 2017.

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.

SIDOOSKI, T. et al. Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2018.

SILVA, H. L. A. et al. Sodium reduction and flavor enhancers addition: is there an impact on the availability of minerals from probiotic Prato cheese? **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, n. March, p. 287–292, 2018.

SKRZYPCZAK, K. et al. Reinforcement of the antioxidative properties of chickpea beverages through fermentation carried out by probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2019.

SOLORZANO, J. L. **Desenvolvimento de bebida à base de quinoa real: uma alternativa ao leite de vaca**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SUCCI, M. et al. Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 60–67, 2017.

TANSAKUL, A.; CHAISAWANG, P. Thermophysical properties of coconut milk. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 3, p. 276–280, 2006.

TERPOU, A. et al. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 32, 2019.

TORRICO, D. D. et al. Consumer rejection threshold, acceptability rates, physico-chemical properties, and shelf-life of strawberry-flavored yogurts with reductions of sugar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2020.

TURKMEN, N.; AKAL, C.; ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 53, n. August 2018, p. 62–75, 2019.

VALENCIA, M. S. et al. Development of creamy milk chocolate dessert added with fructo-oligosaccharide and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 104–109, 2016.

VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M. J. Effect of Inulin on the Viability of *L. plantarum* during Storage and *In Vitro* Digestion and on Composition Parameters of Vegetable Fermented Juices. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 37, n. 2, 2017.

VAN DE GUCHTE, M. et al. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82 p. 187–216, 2002.

VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 10–20, 2018.

VIEIRA, A. D. S. et al. Impact of Acerola (*Malpighia emarginata* DC) Byproduct and Probiotic Strains on Technological and Sensory Features of Fermented Soy Beverages. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3726–3734, 2019.

VOGADO, C. DE O. et al. Enrichment of probiotic fermented milk with green banana pulp: Characterization microbiological, physicochemical and sensory. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 427, 2018.

VOGADO, C. DE O. et al. Survival of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 in Fermented Milk Enriched with Green Banana Pulp Under Acid Stress and in the Presence of Bile Salts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 320-324, 2019.

WANG, J. et al. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2468–2476, 2009a.

WANG, N. et al. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and

chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 589–594, 2009b.

WANG, S.; CHELIKANI, V.; SERVENTI, L. Evaluation of chickpea as alternative to soy in plant-based beverages, fresh and fermented. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, n. July, p. 570–572, 2018.

WGO - WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. Probióticos e prebióticos. 2017. Disponível em: <<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf>>. Acesso em 14 de julho de 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO calls on countries to reduce sugars intake among adults and children. 2015 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/sugar-guideline/en>> Acesso em 31 abril 2020.

XIAO, Y. et al. Genetic control of fatty acid composition in coconut (*Cocos nucifera*), African oil palm (*Elaeis guineensis*), and date palm (*Phoenix dactylifera*). **Planta**, v. 249, n. 2, p. 333–350, 2019.

ZARE, F. et al. Effect of the addition of pulse ingredients to milk on acid production by probiotic and yoghurt starter cultures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 155–160, 2012.

ZHU, K.; PRINCE, R. L. Calcium and bone. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 936–942, 2012

ZIA-UL-HAQ, M. et al. Nutritional and compositional study of Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Punjab, Pakistan. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1357–1363, 2007.