

SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM POLPA DE COCO FERMENTADA ADICIONADA DE PROTEÍNAS VEGETAIS

Mariana Menezes Pombo ¹; Dr.^a Eliana Paula Ribeiro ²

¹ Aluna de Iniciação Científica do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT);

² Professor do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT).

Resumo. *O comércio de produtos derivados do coco verde no Brasil tem um grande problema com a quantidade de resíduos desperdiçados na obtenção da água de coco. Este trabalho visa a avaliar a produção de um produto fermentado com a polpa de coco verde, com bactérias lácticas – *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* – e probióticas – *Bifidobacterium Bb-12*, *Lactobacillus acidophilus LA-5* – assim como visa a sobrevivência destas bactérias neste produto, que detém como ingrediente base a polpa de coco verde. Para a sobrevivência das bactérias foram adicionadas as proteínas de ervilha e/ou de arroz, num total de 2,6 %, com quatro formulações, as duas primeiras contendo 2,6 % de uma única proteína e as outras duas com uma mistura, contendo 2,0 % e 0,6 %. Os resultados obtidos e apresentados mostraram que houve a sobrevivência das bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* – e probióticas – *Bifidobacterium Bb-12*, *Lactobacillus acidophilus LA-5* em todas as amostras, e esta sobrevivência foi maior para a maior parte das bactéria quando se utilizou a proteína de ervilha ou arroz apenas e não misturas. Os produtos apresentaram o comportamento reológico característico de um produto fermentado similar aos iogurtes.*

Introdução

O mercado do coco verde (*Cocos nucifera L.*) sofreu uma grande expansão no Brasil, movido pela crescente demanda por bebidas saudáveis, estas que incluem a água de coco. O país mantém uma posição de destaque na produção global, com uma safra que superou 2,5 milhões de toneladas em 2022, sustentando uma cadeia produtiva que abastece desde pequenos comércios até a indústria de bebidas engarrafadas IBGE (2023), FIRJAN (2022).

Entretanto, o sucesso comercial do coco verde gera um problema ambiental proporcional. A casca e a polpa residual, que constituem de 80 % a 85 % da massa total do fruto EMBRAPA (2004), são resíduos lignocelulósicos de decomposição lenta. O descarte inadequado desses materiais em aterros, praias e vias urbanas tornou-se um problema crônico, contribuindo para a emissão de metano, a contaminação do solo e a sobrecarga dos sistemas de limpeza pública. Estima-se que metade de todo o lixo orgânico nas praias brasileiras seja composta por cascas de coco, com a cidade do Rio de Janeiro gerando sozinha cerca de 600 toneladas diárias deste resíduo Warwick et al (2016).

Neste contexto, a valorização da polpa do coco verde, um subproduto nutritivo e comestível, que era e ainda é tratado como resíduo na produção da água de coco, surge como uma solução estratégica que alia sustentabilidade à inovação tecnológica. Sua aplicação como base para produtos fermentados apresenta-se como uma alternativa promissora para atender ao crescente mercado de consumidores com intolerância à lactose e adeptos de dietas à base de plantas.

Pesquisas pioneiras já demonstraram a viabilidade técnica dessa abordagem. Buoro e Ribeiro (2020) constataram que a adição de 2,0 % de proteína de ervilha foi suficiente para conferir a um fermentado de coco verde características reológicas desejáveis e uma viabilidade adequada das culturas bacterianas. Já Buoro e Ribeiro (2021) avançaram nessa linha, constatando que o ideal seria a adição de 2,6 % de proteínas de ervilha e de arroz misturadas desde que se adicione deste total, no mínimo, 0,6 % de uma das proteínas.

O presente trabalho tem como objetivo principal empregar duas fontes de proteínas vegetais – de ervilha e de arroz – para o fortalecimento da polpa de coco verde, visando à obtenção de um produto fermentado, avaliando a sobrevivência das culturas das bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e as probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, bem como observar a influência das diferentes proteínas, e suas quantidades, nas propriedades reológicas do produto ao longo de 30 dias de armazenamento, sendo refrigerado a 7 °C.

Material e Métodos

Preparação da polpa se coco verde

O coco verde recém-chegado da CEASA foi primeiro higienizado no lavador de legumes (Marca: ATIR) com hipoclorito de sódio por 15 minutos. Em seguida a água de coco foi retirada e passada para um tanque separado e isolada por não ser utilizada, em seguida o coco foi aberto por um cortador (produzido pelo Instituto Mauá de Tecnologia). A polpa foi removida manualmente e colocada no Vorwerk (Marca: Thermomix), junto a 1 % de ácido ascórbico (em relação a massa de coco) – para evitar a mudança de cor do produto – a polpa passou por um tratamento térmico de 90 °C por 5 minutos em bateladas de 2 L e fracionada em pacotes herméticos de 1 Kg, logo após foi congelada no ultrafreezer (Marca: Klimaquip, UKI05, Brasil).

Caracterização da polpa de coco verde

A polpa de coco não fermentada foi avaliada por meio das seguintes análises físico-químicas e microbiológicas:

- Umidade, utilizando a secagem em estufa a vácuo (modelo TE-395, Tecnal, Brasil) a 70°C e vácuo de 100 mmHg (método 013/IV, IAL, 2008);
- Proteínas, pelo método de Kieldahl modificado (método 036/IV, IAL, 2008);
- Lipídeos, pelo método de Bligh-Dver (Bligh-Dver, 1959);
- Açúcares redutores em glicose (método 038/IV, IAL, 2008);
- Açúcares não redutores em sacarose (método 039/IV, IAL, 2008);
- Fibras alimentares totais, pelo método enzimático-gravimétrico utilizando kit de enzimas de Megazymes modelo K-TDFR-100A (método 045/IV, IAL, 2008Prosky et al.,1992);
- Cinzas, pela incineração em mufla (modelo O.318.24. Ouimis, Brasil) (método 018/IV, IAL, 2008);
- Carboidratos por diferença;
- Atividade de água, utilizando equipamento Aqualab (série 3 TE, EUA);
- O plano de amostragem e os limites descritos em IN nº 161/2022 (ANVISA, 2022) para: *Salmonella* (método BAM/FDA: 2016); *Escherichia coli* (metodologia NMP APHA 9:2015) e Bolores e Leveduras (metodologia APHA 21:2015) descritos em SILVA *et al.*(2017) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Plano de amostragem para polpas e purês de frutas

Microrganismo	Parâmetros e limites
<i>Salmonella</i> / 25 g	n = 10; c = 0; m = Ausência
<i>Escherichia coli</i> / g	n = 5 ; c = 2; m = 10 ; M = 10 ²
Bolores e Leveduras / g	n = 10; c = 1; m = 10 ³ ; M = 10 ⁴

*Em que n – número de unidades amostrais; c – número de amostrais toleradas com quantidade intermediária; m – limite microbiológico estabelecido (2 classes) e limite microbiológico de “qualidade aceitável” e “qualidade intermediaria” (3 classes); M – limite microbiológico de “qualidade intermediaria” e “qualidade inaceitável” (3 classes).

Processo fermentativo

Utilizando 2 Kg da polpa preparada foi adicionado: 0,46 % de bicarbonato de sódio para o ajuste do pH inicial da polpa em torno de 5,6 e 2,6 % de proteínas – conforme descrito por Buoro e Ribeiro (2021) total de 2,6 % de proteínas, seja de ervilha, de arroz, ou uma junção – seguido de um tratamento térmico de 90 °C por 5 minutos no Vorwerk (Marca: Thermomix) e resfriada rapidamente a 45 °C em um banho de gelo. Adicionou-se 2 % – em relação a massa total do produto – de fermento láctico contendo as bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* e as bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus LA-5* e *Bifidobacterium Bb-12* (pertencentes a cultura: ABY-3).

Em seguida a amostra foi dividida em duas, metade foi colocada em tubos de ensaio de 70 mL identificados, e incubados 43 °C para ocorrência do processo de fermentação. A cada meia hora um tubo foi retirado e resfriado a no mínimo 25 °C para interromper a fermentação, e realização da medida do pH, até se alcançar a coagulação no pH de 4,8. Processo realizado para produção de todas as amostras, independente das proteínas utilizadas.

A outra metade da amostra foi transferida para potes de plástico de 250 mL, que também foram incubados a 43 °C até sua coagulação. Após sua coagulação, as amostras foram resfriadas e armazenadas a 7 °C para a determinação dos parâmetros reológicos.

Foram realizados quatro ensaios nos quais se variou as concentrações de proteínas de ervilha e arroz de forma a totalizar 2,6 % de proteínas conforme sugerido por Buoro e Ribeiro (2021). No primeiro ensaio utilizou-se 2,0 % de proteína de arroz e 0,6 % de ervilha, no segundo 2,6 % de proteína de ervilha, no terceiro 2,6 % de proteína de arroz e no quarto 2,0 % de proteína de ervilha e 0,6 % de proteína de arroz. A ordem dos ensaios foi sorteada.

Determinação da população microbiana nas amostras

A quantidade de bactérias foi determinada por meio da metodologia de contagem descrita por Silva (2021) e utilizada por Buoro e Ribeiro (2021), realizada em placas de Petri em duplicatas para cada diluição.

A determinação da bactéria probiótica *Bifidobacterium Bb-12* foi realizada com o meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe) adicionado da solução ABC, inoculada pelo método de profundidade e incubada em um jarro de anaerobiose a 37 °C. Para a determinação da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus LA-5* foi utilizado o mesmo meio MRS, mas a inoculação foi feita por superfície e sua incubação também foi feita de maneira anaeróbica a 43 °C.

A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi determinada também em MRS, que foi acidificado até o pH estar na faixa de 5,2 a 5,5, pelo método de profundidade, incubada a 37 °C. E a determinação da população de *Streptococcus thermophilus* foi realizada com o uso do meio M17 pelo método de profundidade em sobre camada e incubação a 37 °C.

As análises foram todas iniciadas um dia após o processo fermentativo e semanalmente durante 30 dias.

Análise Reológica

Para a medida da viscosidade aparente das amostras a 25 °C foi utilizado o reômetro (Brookfield, modelo DV3T) conectado ao programa Rheocalc T 1.2.19. Utilizou-se o *spindle* SC4-25 variando entre 6,0 a 202,0 rpm (crescente e depois decrescente), os testes foram realizados no primeiro dia após o processo de fermentação e após 30 dias de armazenamento a 7 °C.

O modelo matemático que descreve o comportamento reológico é o de Ostwald-de Waele (Lei da Potência), conforme a equação 2.

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

τ : Tensão de cisalhamento, em Pa;

γ : Taxa de cisalhamento, em s^{-1} ;

n: Índice de comportamento;
K: Índice de consistência do fluido.

Resultados e Discussão

Caracterização da polpa de coco verde

Foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas das propriedades da polpa do coco in natura, anterior a realização do processo de fermentação.

A polpa de coco analisada possui $(84,57 \pm 0,05)$ % de umidade, $(1,45 \pm 0,01)$ % de proteínas, $(4,61 \pm 0,14)$ % de lipídios, $(0,98 \pm 0,01)$ % de cinzas, 8,38 % de carboidratos, $(1,33 \pm 0,01)$ de fibras, $(2,21 \pm 0,02)$ % de açúcares redutores e $(4,05 \pm 0,04)$ % de não redutores. Apresentou acidez titulável de $(1,72 \pm 0,03)$ g de ácido láurico/100 g, pH de $(4,39 \pm 0,01)$, Aw de $(0,99 \pm 0,00)$ e teor de sólidos solúveis $(8,94 \pm 0,48)$ %.

Os resultados obtidos mostram que a polpa apresentou um teor mais elevado de carboidratos e menor teor de umidade que os obtidos por Correa e Ribeiro (2018), esta diferença pode ser atribuída a um estágio de maturação diferente e mais avançado da polpa utilizada neste trabalho, devido ao alto teor de açúcares redutores presentes.

Segundo das análises microbiológicas, a polpa de coco se encontra dentro dos padrões fornecidos pela IN nº 161/2022 (ANVISA, 2022), citada anteriormente na Tabela 1, tendo ausência de *Salmonella*, 5 NMP de *Escherichia coli* e 115 UFC/mL de bolores e leveduras, resultados dentro do limite aceito para polpas e purês.

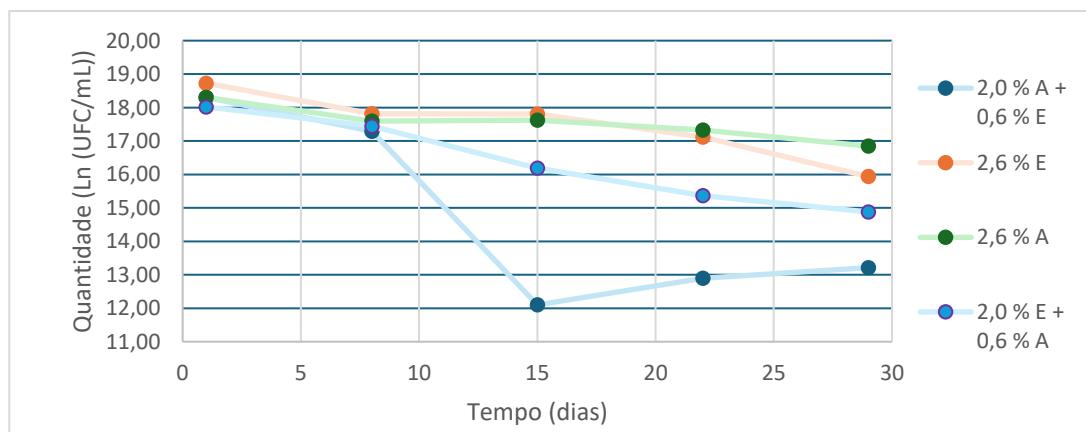
Processo Fermentativo

A coagulação da polpa de coco verde ocorreu num pH em torno de 4,8 em todas as amostras, num tempo médio de 165 minutos, sendo as formulações contendo proteína de arroz as mais demoradas, este tempo é condizente no tempo esperado na fermentação de bactérias como a *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, na produção de iogurtes onde a média é em torno de 180 minutos. O efeito tamponante das proteínas de ervilha e arroz está de acordo com os trabalhos de Buoro e Ribeiro (2020), e Buoro e Ribeiro (2021), uma vez que houve o crescimento e sobrevivência das bactérias. O pH final das amostras após os 30 dias de armazenamento se mantiveram em torno de $4,64 \pm 0,04$.

População das bactérias lácticas e probióticas

Os resultados obtidos na determinação da população das bactérias lácticas e probióticas durante o tempo de armazenamento de 30 dias são apresentados nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

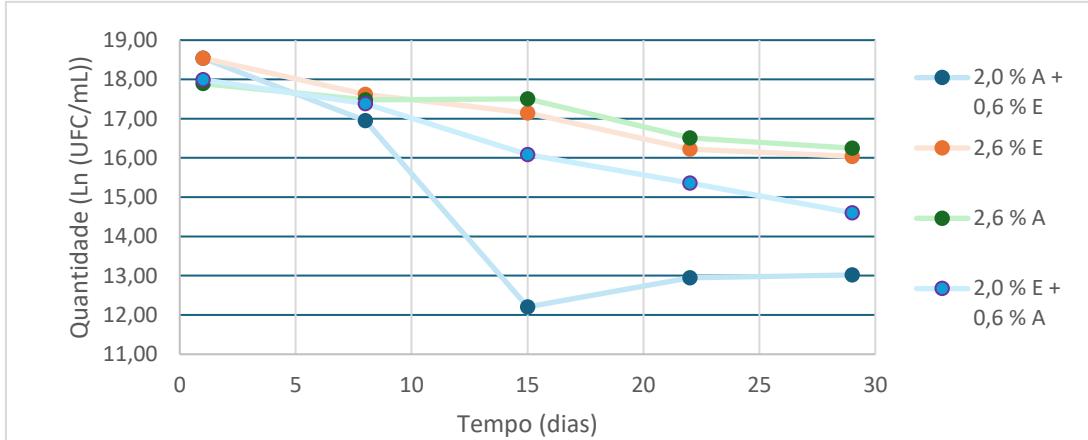
Figura 1 – Sobrevida da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus LA-5*



*Em que E – Proteína de Ervilha; A – Proteína de Arroz

Os resultados obtidos e apresentados na Figura 1 demonstram que houve a sobrevivência da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus LA-5* em todas as amostras, entretanto foi maior na amostra contendo apenas proteína de ervilha ou de arroz, houve redução quando as duas proteínas foram misturadas indicando um sinergismo negativo e não houve diferença significativa entre uma ou outra proteína sozinha.

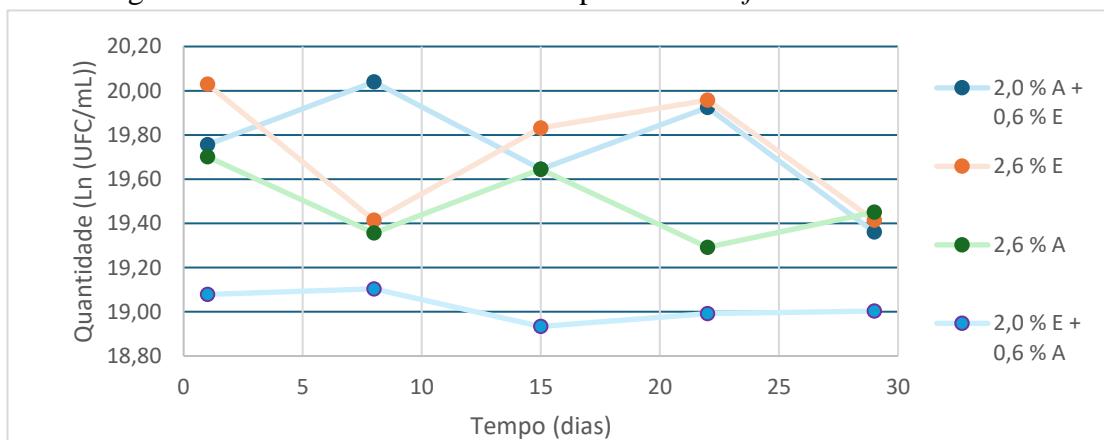
Figura 2 – Sobrevivência da bactéria *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*



*Em que E – Proteína de Ervilha; A – Proteína de Arroz

Os resultados obtidos e apresentados na Figura 2 demonstram que houve a sobrevivência da bactéria *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* em todas as amostras, observa-se o mesmo comportamento apresentado na Figura 1, a população de bactérias foi maior na amostra contendo apenas proteína de ervilha ou de arroz, houve redução quando as duas proteínas foram misturadas indicando um sinergismo negativo e não houve diferença significativa entre uma ou outra proteína sozinha. Nas misturas a sobrevivência da bactéria láctica foi maior quando se utilizou uma concentração mais alta de proteína de ervilha.

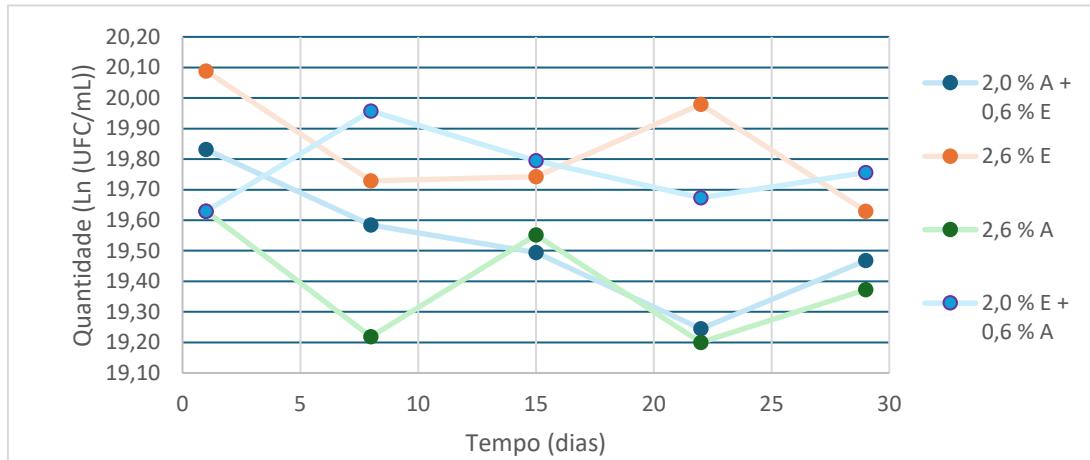
Figura 3 – Sobrevivência da bactéria probiótica *Bifidobacterium Bb-12*



*Em que E – Proteína de Ervilha; A – Proteína de Arroz

Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que houve a sobrevivência da bactéria *Bifidobacterium Bb-12* em todas as amostras, observa-se que ao final do tempo de armazenamento a população de bactérias apresentou diferença não entre as amostras contendo apenas proteína de ervilha ou de arroz ou mistura de 2,0 % de proteína de arroz e 0,5 % de proteína de ervilha. A variação na população da bactéria Bb-12 ao longo do tempo foi muito pequena, a diferença entre o valor inicial e o final não foi significativo. Estes resultados mostram que o tipo de proteína arroz ou ervilha não influenciou de forma significativa na sobrevivência desta população ao longo do armazenamento por 30 dias a 7 °C.

Figura 4 – Sobrevida da bactéria *Streptococcus thermophilus*



*Em que E – Proteína de Ervilha; A – Proteína de Arroz

Os resultados obtidos e apresentados na Figura 4 demonstram que houve a sobrevida da bactéria láctica *Streptococcus thermophilus* em todas as amostras, entretanto houve uma redução na sua população ao longo do tempo e que foi maior nas amostras contendo maior concentração de proteína de ervilha.

Comportamento Reológico

Na Tabela 2 estão apresentados os valores obtidos para os parâmetros reológicos analisados, todas as amostras mostraram um alto índice de consistência inicialmente, que foram decaindo ao longo dos 30 dias de análise, o que também foi observado em Buoro e Ribeiro (2021).

Tabela 2 – Parâmetros Reológicos obtidos no reômetro (Brookfield)

Amostra	K inicial	K final	n inicial	n final
2,6 % E	29,897	25,499	0,3432	0,2420
2,6 % A	29,357	20,549	0,2638	0,2418
2,0 % E + 0,6 % A	29,618	19,586	0,2832	0,2607
2,0 % A + 0,6 % E	31,823	30,014	0,3084	0,1942

*Em que K – Índice de Consistência do fluido; n – Índice de Comportamento do fluido; E – Proteína de Ervilha; A – Proteína de Arroz

Como pode ser observado na Tabela 2, os valores de K inicialmente estão muito próximos, com um desvio padrão de $\pm 0,9$, que indica não haver uma diferença significativa na consistência na formulação pelas proteínas utilizadas, isto não pode ser dito para os valores finais de K pois exibiram desvios maiores entre as amostras, mostrando que mesmo não influenciando em sua consistência inicial as proteínas e suas diferentes concentrações entre as amostras influenciam sua reologia ao longo do tempo.

O modelo da lei de potência descrito na Equação 2 avalia a diferença entre a amostra e o comportamento newtoniano de um fluido, onde um comportamento como o descrito nestas análises, ou seja, $K = \mu$ e $n < 1$, se configura como um comportamento pseudoplástico Toneli et al (2005), caracterizado então como um fluido não-newtoniano, o que era esperado já que é um produto fermentado semelhante a um iogurte, que também apresenta $n < 1$.

Os resultados obtidos para os valores de K foram maiores que os obtidos por Buoro e Ribeiro (2021) indicando a maior consistência dos produtos em função do tipo e concentração das proteínas de ervilha e arroz utilizadas neste trabalho.

Conclusões

Os resultados obtidos e apresentados mostraram que houve a sobrevivência das bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* – e probióticas – *Bifidobacterium Bb-12*, *Lactobacillus acidophilus LA-5* em todas as amostras, e esta sobrevivência foi maior para a maior parte das bactéria quando se utilizou a proteína de ervilha ou arroz apenas e não misturas. Os produtos apresentaram o comportamento reológico característico de um produto fermentado similar aos iogurtes.

Referências Bibliográficas

- Brasil, Ministério da Agricultura e Pecuária. (26 de agosto de 2024) *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de composto lácteo*. Brasil, Portaria SDA/MAPA nº 1.170.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (30 de janeiro de 2020) *Instrução Normativa*. Brasil, edição 22 nº 9.
- Buoro, O.; Ribeiro, E. (2020) *Efeito do fortalecimento da polpa de coco verde com proteínas na sobrevivência de bactérias lácticas probióticas e nas propriedades reológicas de um produto fermentado*. Anais do 12º Seminário Mauá de Iniciação Científica, São Caetano do Sul.
- Buoro, O.; Ribeiro, E. (2021) *Influência de proteínas vegetais na sobrevivência de bactérias probióticas, nas propriedades reológicas da polpa de coco verde fermentada*. Anais do 13º Seminário Mauá de Iniciação Científica, São Caetano do Sul.
- Correia, N. O.; Ribeiro, E. (2018) *Efeito do fortalecimento da polpa de coco verde com proteínas na sobrevivência de bactérias lácticas e nas propriedades reológicas do produto fermentado*. Anais do 9º Seminário Mauá de Iniciação Científica, São Caetano do Sul.
- Cordeiro, N. O.; Ribeiro, E. (2017) *Efeito do fortalecimento da polpa de coco verde com proteínas na sobrevivência de bactérias lácticas e nas propriedades reológicas do produto fermentado*. Anais do 8º Seminário Mauá de Iniciação Científica, São Caetano do Sul.
- EMBRAPA (2004), *Coco: processamento artesanal do coco verde*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza.
- FIRJAN, Federação das indústrias do estado do rio de janeiro (2022) *A indústria de alimentos e a economia do estado do Rio de Janeiro*. Disponível em: <https://www.firjan.com.br>.
- IAL, Instituto Adolfo Lutz (2008) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Edição 4. Disponível em: IAL, Instituto Adolfo Lutz (2008) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. Edição 4. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>.
- IBGE (2023), *Sistema de Recuperação Automática – SIDRA*. Produção Agrícola Municipal: Coco-da-baía. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>.
- Pimentel, K.; Ribeiro, E. (2016) *Processos fermentativos da polpa de coco verde por bactérias lácticas*. Anais do 7º Seminário Mauá de Iniciação Científica, São Caetano do Sul.
- Rodriguez, T. Z. (2022) *Polpa de coco verde (*Cocos nucifera Linn*) no desenvolvimento de alimentos: uma revisão integrativa*. Brasil, universidade Federal da Paraíba.
- Santana, I. A. (2012) *Avaliação química e funcional de polpa de coco verde e aplicação em gelado comestível*. Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul.
- Silva, N. (2021). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. 6ª edição. São Paulo, Editora Blucher.
- Silva, N.D.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.D.A.; Taniwaki, M.H.; Gomes, R.A.R.; Okazaki, M.M. (2017) *Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos e água*, Editora Blucher.
- Tetra Pak, (2016) *Coconut Handbook. Coconut Knowledge Centre (CKC)*, Cingapura.

- Toneli, J. T. L.; Murr, F. E. X.; Park, K. J. (2005) *Estudo da Reologia de Polissacarídeos Utilizados na Indústria de Alimentos*. Campinas Grande, Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.7, n.2, p.181-204.
- Warwick, D. R. N.; Leal, E. C.; Passos, E. E. M.; Cintra, F. L. D.; Amorim, J. R. A. D.; Sobral, L. F.; Siqueira, L. A.; Cuenca, M. A. G.; Resende, R. S.; Menezes, W. (2016) *Coleção – Plantar Coco*, Brasília, Embrapa.