

**UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PRODUTO SIMBIÓTICO À BASE DE LEITE DE COCO (*Cocos  
nucifera*) E KEFIR DETERMINA PROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE  
TÉRMICO E QUÍMICO NO ORGANISMO MODELO *Caenorhabditis  
elegans* VIA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSPECIES REATIVAS  
DE OXIGÊNIO**

**RAIANA MARIA PRÚCOLI FALSONI**

**VILA VELHA**  
**ABRIL/2023**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PRODUTO SIMBIÓTICO À BASE DE LEITE DE COCO (*Cocos  
nucifera*) E KEFIR DETERMINA PROTEÇÃO CONTRA O  
ESTRESSE TÉRMICO E QUÍMICO NO ORGANISMO MODELO  
*Caenorhabditis elegans* VIA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE  
ÉSPECIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

**RAIANA MARIA PRÚCOLI FALSONI**

**VILA VELHA**  
**ABRIL/2023**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F197p

Falsoni, Raiana Maria Prúcoli.

Produto simbiótico à base de leite de coco (*Cocos nucifera*) e kefir determina proteção contra o estresse térmico e químico no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* via redução da produção de espécies reativas de oxigênio / Raiana Maria Prúcoli Falsoni – 2023.

103 f. : il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade Vila Velha, 2023.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Estresse oxidativo.  
3. Probiótico. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

RAIANA MARIA PRÚCOLI FALSONI

**PRODUTO SIMBIÓTICO À BASE DE LEITE DE COCO (*Cocos  
nucifera*) E KEFIR DETERMINA PROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE  
TÉRMICO E QUÍMICO NO ORGANISMO MODELO *Caenorhabditis  
elegans* VIA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSPECIES REATIVAS  
DE OXIGÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de abril 2023

Banca Examinadora:



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Girlandia Alexandre Brasil  
(UVV – Universidade Vila Velha)



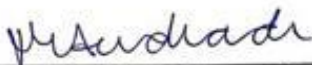
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ewelyne Miranda de Lima  
(UVV – Universidade Vila Velha)



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karla Oliveira dos Santos Cassaro  
(Faculdade Multivix)



---

Prf. Dr. Tadeu Uggere de Andrade  
(UVV – Universidade Vila Velha)  
Orientador

Dedico este trabalho ao meu marido, Renan, aos meus pais, Walter e Lourdes, e aos meus irmãos e cunhada, Raquel, Rainério e Anna. Sem o apoio e incentivo da minha família esse dia jamais teria chegado.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, Nossa Senhora e ao meu santo Anjo da Guarda, pela presença, proteção, por me ampararem em todos os momentos e proporcionarem mais do que mereço.

Agradeço ao meu amado marido, Renan, por ser meu porto seguro, meu parceiro de vida e por sempre apoiar e acreditar em mim. Pelo cuidado e paciência, obrigada, meu amor!

Agradeço aos meus pais, irmãos e cunhada, Walter, Lourdes, Raquel, Rainério e Anna. Vocês são minhas fontes inesgotáveis de amor, felicidade, compreensão e paz.

Agradeço ao Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, pela oportunidade de ser sua aluna, dedicar seu tempo ao nosso projeto e compreender minhas faltas e limitações. Foi uma honra ter sido orientada por um pesquisador tão brilhante, íntegro e humano. Obrigada, professor!

Agradeço à Maressa, minha parceira da iniciação científica, mãos e braços desse projeto, responsável pela realização da maior parte das análises. Não conseguiria descrever minha gratidão por tudo o que fez por esse trabalho. Obrigada, minha querida! Você é única!

Às Profas. Dr<sup>a</sup>. Girlandia Alexandre Brasil e Dr<sup>a</sup> Ewelyne Miranda de Lima, pela confiança, dedicação e paciência. Obrigada por me receberem com tanto amor, pela compreensão nos momentos difíceis, por sempre terem uma palavra de incentivo e não me deixarem desanimar. Vocês me inspiram!

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone, por dedicar seu tempo e contribuir com a correção desse trabalho. Obrigada, professora!

Aos demais professores do programa de pós-graduação e funcionários da UVV, que estão sempre à disposição para nos ensinar e ajudar, disponibilizando seu tempo e contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa de nossa instituição.

À minha querida amiga Flávia, que foi meu amparo e família em Vila Velha. Sua presença contribuiu para meu crescimento e amadurecimento enquanto profissional e, sobretudo, como ser humano.

À amiga, Placy, responsável pelo primeiro passo e ingresso na pós-graduação. Agradeço o incentivo, apoio e força de sempre, minha amiga.

Aos amigos queridos que fiz no laboratório desde o mestrado, Lauro, Atyla, Thainá, Raylton, Ávila, Roque, Carol e Cris, agradeço a parceria de cada um. A ajuda de vocês foi imprescindível para o desenvolvimento dessa e de outras pesquisas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a construção desse trabalho. Não seria possível sem a ajuda de cada um de vocês.

À Universidade Vila Velha (UVV) por contribuir com a estrutura, materiais e pessoal. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e tornarem possível o desenvolvimento dessa pesquisa e de tantas outras em todo o país!

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Fundamentação teórica.....	14
2.1. Estresse oxidativo.....	14
2.2. Doenças crônicas não transmissíveis.....	18
2.3. Microbiota intestinal.....	23
2.4. Probióticos.....	25
2.5. Kefir.....	28
2.6. Kefir de água.....	31
2.7. Coco.....	33
2.8. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	34
2.9. Hipótese.....	36
3. Objetivos.....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. Material e métodos.....	38
4.1. Material.....	38
4.2. Preparo do leite de coco.....	38
4.3. Preparo dos produtos fermentados.....	38
4.4. Delineamento experimental.....	39
4.5. Atividade antioxidante in vitro: ABTS, DPPH e FRAP.....	40
4.6. Determinação do pH.....	43
4.7. Caracterização da bebida de leite de coco fermentada.....	43
4.7.1. Determinação da acidez titulável.....	43
4.7.2. Determinação da composição centesimal.....	43
4.7.3. Análise microbiológica.....	43
4.7.4. Polifenóis totais.....	44



4.7.5.	Ensaio <i>in vivo</i> .....	44
4.7.5.1.	Cepas de <i>C. Elegans</i> , manutenção e sincronização.....	45
4.7.5.2.	Tratamento.....	45
4.7.5.3.	Avaliação da mortalidade.....	46
4.7.5.4.	Análise do desenvolvimento.....	46
4.7.5.5.	Medição de EROs intracelular.....	47
4.7.6.	Ensaio para estresse.....	47
4.7.6.1.	Estresse térmico.....	47
4.7.6.2.	Estresse químico.....	47
4.8.	Análise estatística.....	48
5.	Resultados.....	48
5.1.	Caracterização da bebida selecionada.....	48
5.1.1.	Análise da composição centesimal.....	48
5.1.2.	Análise microbiológica, pH e acidez total titulável.....	49
5.1.3.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	50
5.2.	Análise <i>in vivo</i> utilizando o modelo experimental <i>C. Elegans</i> .....	50
5.2.1.	Toxicidade.....	50
5.2.2.	Medição de ERO intracelular em <i>C. Elegans</i> .....	52
5.2.3.	Estresse químico.....	53
5.2.4.	Estresse térmico.....	54
6.	Discussão.....	55
7.	Conclusão.....	69
8.	Referências.....	70

## RESUMO

FALSONI, RAIANA MARIA PRÚCOLI, D. Sc, Universidade Vila Velha – ES, abril de 2023. **Produto Simbiótico à base de leite de coco (*Cocos Nucifera*) e Kefir determina proteção contra o estresse térmico e químico no organismo modelo *Caenorhabditis Elegans* via redução da produção de espécies reativas de oxigênio.** Orientador: Dr. Tadeu Uggere de Andrade.

As espécies reativas de oxigênio desencadeiam o chamado estresse oxidativo, que está relacionado ao desenvolvimento das doenças crônicas. O estilo de vida ocidental, que envolve o alto consumo de alimentos ultraprocessados, predispõe o desenvolvimento do estresse oxidativo. Alternativas terapêuticas têm sido estudadas com o intuito de desenvolver ferramentas para controle do estresse oxidativo. Nesse contexto, a modulação da microbiota intestinal tem se destacado e o kefir tem sido amplamente investigado. Diferentes substratos são utilizados para sua fermentação e o coco surge como mais uma opção. Portanto, o objetivo desse estudo foi desenvolver um produto à base de leite de coco, fermentado pelos grãos de kefir, e avaliar seu potencial antioxidante. As concentrações do leite de coco, kefir e temperatura foram estabelecidas pela literatura. O produto com melhor potencial antioxidante foi determinado pelas análises de pH, ABTS, DPPH e FRAP e caracterizado por análise microbiológica, composição centesimal, polifenóis totais e acidez total titulável. A bebida foi testada no modelo *in vivo* *C. Elegans*. Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), ajustado para múltiplas comparações, e a significância da diferença entre as médias foi determinada por teste post-hoc de Tukey. Os resultados foram expressos como média,  $\pm$  E.P.M., com significância aceita acima de 5%. As análises de toxicidade demonstraram que o produto não afeta o desenvolvimento dos nematoides. Além disso, o leite de coco fermentado com kefir preveniu o desenvolvimento das espécies reativas de oxigênio no modelo estudado, assim como possibilitou maior sobrevivência dos nematoides, quando submetidos ao estresse térmico e químico. Portanto, a bebida elaborada aparece como possível opção de alimento simbiótico não lácteo, com potencial simbiótico, antioxidante e expressivo valor nutricional.

**Palavras-chave:** probiótico, antioxidante, estresse oxidativo, microbiota intestinal, alimento funcional.

## ABSTRACT

FALSONI, RAIANA MARIA PRÚCOLI, D. Sc, Universidade Vila Velha – ES, april de 2023. **Symbiotic Product based on coconut milk (*Cocos Nucifera*) and Kefir determines protection against thermal and chemical stress in the model organism *Caenorhabditis Elegans* via reduced production of reactive oxygen species.** Advisor: Dr. Tadeu Uggere de Andrade.

Reactive oxygen species trigger the so-called oxidative stress, which is related to the development of chronic diseases. The Western lifestyle, which involves high consumption of ultra-processed foods, predisposes to the development of oxidative stress. Therapeutic alternatives have been studied in order to develop tools to control oxidative stress. In this context, the modulation of the intestinal microbiota has been highlighted and kefir has been widely investigated. Different substrates are used for its fermentation and coconut appears as another option. Therefore, the aim of this study was to develop a product based on coconut milk, fermented by kefir grains, and evaluate its antioxidant potential. The concentrations of coconut milk, kefir and temperature were established in the literature. The product with the best antioxidant potential was determined by pH, ABTS, DPPH and FRAP analyzes and characterized by microbiological analysis, centesimal composition, total polyphenols and total titratable acidity. The drink was tested in the in vivo model *C. Elegans*. The results were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA), adjusted for multiple comparisons, and the significance of the difference between means was determined by Tukey's post-hoc test. Results were expressed as mean,  $\pm$  SEM with accepted significance greater than 5%. Toxicity analyzes demonstrated that the product does not affect the development of nematodes. Furthermore, coconut milk fermented with kefir prevented the development of reactive oxygen species in the studied model, as well as enabled greater survival of nematodes when subjected to thermal and chemical stress. Therefore, the elaborate drink appears as a possible option for a non-dairy symbiotic food, with symbiotic, antioxidant potential and significant nutritional value.

Keywords: probiotic, antioxidant, oxidative stress, intestinal microbiota, functional food.

## 1. Introdução

O estilo de dieta ocidental, apesar de não ter uma definição específica, é uma dieta não saudável, geralmente composta por uma grande quantidade de gorduras e carboidratos simples e baixa ingestão de vitaminas, minerais e compostos funcionais (Malesza *et al.*, 2021). Esse padrão alimentar está associado ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como as chamadas doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs). As doenças crônicas se caracterizam por um conjunto de patologias de múltiplas causas e fatores de risco, longos períodos de latência e curso prolongado. Além disso, têm origem não infecciosa e podem resultar em incapacidades funcionais (Alwan, 2010). O controle e a prevenção das DCNTs apresentam-se como uma questão emergencial e de saúde pública em todo o mundo (Brasil, 2008).

Os subprodutos do metabolismo endógeno, as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), são produzidas por diversos processos endógenos e exógenos, e seus efeitos são neutralizados por defesas antioxidantes. O estresse oxidativo (EO) ocorre a partir do desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidantes disponíveis (Liguori *et al.*, 2018), e desempenham um papel importante no desenvolvimento das DCNTs e suas complicações metabólicas associadas (Zielińska-Bliźniewska *et al.*, 2019).

O EO induzido pelas EROs, estimula a resposta inflamatória, desencadeando o aumento da permeabilidade intestinal (Rezaie, Parker & Abdollahi, 2007), e alterações na composição da população bacteriana residente, ou seja, na microbiota (Tralongo *et al.*, 2014). A chamada disbiose – redução da diversidade microbiana e desequilíbrio entre as bactérias benéficas e as bactérias

prejudiciais -, é uma consequência direta da cascata inflamatória desencadeada pelos radicais livres e pode favorecer o desenvolvimento de doenças crônicas, por meio da ativação de diferentes vias de sinalização (Mell *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a modulação da microbiota intestinal (MI) por meio da ingestão de alimentos com propriedades funcionais, que exercem atividades sobre o metabolismo e melhoram as condições fisiopatológicas envolvidas nas doenças crônicas, surgem como alternativas não medicamentosas importantes (Prado *et al.*, 2015). Os chamados alimentos funcionais, são alimentos que, além do seu valor nutritivo, têm um impacto positivo na saúde (Palou, Serra & Pico 2003). Eles contêm compostos bioativos antioxidantes, capazes de prevenir ou diminuir a ocorrência de DCNTs, tais como hipertensão (Moreno-Montoro *et al.*, 2017; Ardiansyah *et al.*, 2008), diabetes (Hu *et al.*, 2019) e obesidade (Verón *et al.*, 2019).

Dentre os alimentos descritos como “funcionais”, os probióticos vêm ganhando destaque. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), trata-se de organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (WHO, 2003). Dentro desse conceito, o kefir, produto fermentado a partir da ação de bactérias e leveduras, podendo ser a base de leite, água ou outros produtos, vem sendo difundido e amplamente estudado (Vieira *et al.*, 2021; Farag *et al.*, 2022). Os benefícios de seu consumo crônico envolvem a modulação da microbiota, com diversos benefícios, dentre eles, destaca-se o controle do EO (Vieira *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2015; Prado *et al.*, 2015).

O tipo de bebida à base de kefir mais divulgado é a resultante da fermentação do leite de vaca pelos grãos. Entretanto, o “leite vegetal” têm sido uma alternativa crescente e promissora para o desenvolvimento de produtos alimentícios e bebidas funcionais em todo o mundo (Kehinde *et al.*, 2020; Rasika *et al.*, 2020). A alergia ao leite de vaca, intolerância à lactose, atenção às calorias e não menos importante, a adesão às dietas veganas e vegetarianas, têm influenciado os consumidores na escolha de substitutos ao leite de vaca (Rutkowska *et al.*, 2022). As alternativas de produtos vegetais são uma tendência crescente, que podem servir como opção viável e de baixo custo (Mauro & Garcia, 2019; Rutkowska *et al.*, 2022).

Diante dos diversos tipos de “leite vegetal”, o coco surge como novo substrato para o processo de fermentação (Mauro *et al.*, 2022). O *Cocos nucifera* é uma importante árvore frutífera cultivada no mundo todo. Acredita-se ser antiblenorrágico e antibronquite. Além disso, o coco fornece um bom valor nutricional pois é rico em vitaminas do complexo B e quantidade substancial de aminoácidos (Srinivasan *et al.* 1964).

Para o estudo dos alimentos funcionais e desenvolvimento de produtos à base de compostos bioativos, diversos modelos são utilizados (Peluso *et al.*, 2016; Jama, Kaye & Marques, 2019; Agulló *et al.*, 2022). Em geral, os pesquisadores buscam por modelos que atendam aos objetivos do projeto e que, ao mesmo tempo, sejam viáveis economicamente, de fácil manejo e manipulação e que permitam resultados confiáveis (Agulló *et al.*, 2022). Diante disso, o *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) tem se destacado. Trata-se de um nematoide de vida livre, que se alimenta de bactérias e apresenta fácil cultivo, curto ciclo de vida e reprodutibilidade, e boa capacidade de reproduzir

populações isogênicas sincronizadas (Park *et al.*, 2014). A segurança dos resultados se baseiam no fato da semelhança existente entre as células intestinais dos *C. elegans* e as células intestinais dos humanos, permitindo que estes nematódeos sejam utilizados também para investigar a ação dos probióticos como agentes promotores de saúde (Park *et al.*, 2014)

Portanto, diante das evidências apresentadas, acredita-se que um alimento à base de kefir, fermentado em matriz não láctea à base de leite de coco, pode ser capaz de reduzir o EO e efeitos causados pelos radicais livres.

A hipótese do presente estudo é a de que a fermentação do kefir em matriz não láctea à base de leite de coco, em diferentes concentrações, do inóculo e da temperatura, determinará a obtenção de produto vegetal com efeito protetor contra o EO, testado *in vitro* e no modelo *in vivo*, *C. Elegans*.

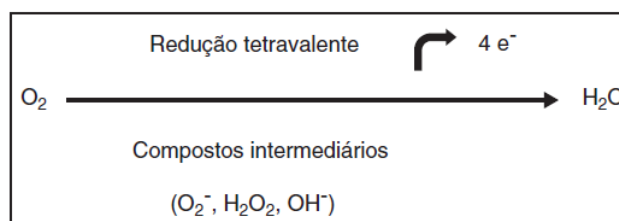
## **2. Fundamentação teórica**

### **2.1. Estresse Oxidativo**

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada externa, sendo formados principalmente quando o oxigênio interage com determinadas moléculas (Chandrasekaran, Idelchik & Melendez, 2017). Essa configuração os faz altamente instáveis e quimicamente muito reativos (Halliwell & Gutteridge, 2007). Os ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) referem-se a radicais reativos e derivados do oxigênio e do nitrogênio, respectivamente (Powers *et al.*, 2011).

Trata-se de produtos instáveis, decorrentes da redução tetravalente sofrida pela molécula de oxigênio, aceitadora final de elétrons, durante a produção de

energia, na etapa de fosforilação oxidativa (Figura 1) (Halliwell & Gutteridge, 2022). As principais ERO distribuem-se em 2 grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) e alcoxila ( $\text{RO}\cdot$ ), e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (Buschwald, 2005).



**Figura 1** Redução tetravalente da molécula de  $\text{O}_2$ . Formação de compostos intermediários, espécies reativas ao oxigênio (ERO), como  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (ânion superóxido),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio),  $\text{OH}^-$  (radical hidroxila).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) estão envolvidas na remoção de energia de moléculas orgânicas, no desajuste do sistema imunológico e em alterações no processo de sinalização celular (Genestra, 2007). Existem fontes endógenas e exógenas de ERONs:

As fontes endógenas incluem a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase, a mieloperoxidase (MPO), a lipoxigenase e a angiotensina II (Angio II) (Salisbury & Bronas, 2015).

A NADPH oxidase é a fonte prevalente do ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que é formado pela redução de um elétron do oxigênio molecular, com elétrons fornecidos pelo NADPH, durante a respiração celular (Genestra, 2007). A maior parte do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é dismutado em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é um radical livre porque não possui elétrons



desemparelhados, mas é capaz de formar um íon hidroxila altamente reativo ( $\text{OH}^\bullet$ ). Os radicais hidroxila reagem especialmente com os fosfolipídios nas membranas celulares e proteínas. Por outro lado, nos neutrófilos, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de cloreto e MPO, pode ser convertido em ácido hipocloroso, uma ERO que afeta principalmente as proteínas celulares (Genestra, 2007).

O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da L-arginina por três isoformas principais do óxido nítrico sintase (NOS): NOS epitelial, associado à vasodilatação e regulação vascular, NOS neuronal, relacionado à sinalização intracelular, e NOS induzível, ativado em resposta aos sinais de endotoxinas ou citocinas (Adams, Franco & Estevez, 2015). O  $\text{O}_2$  pode reagir com o NO e formar outra molécula, nesse caso, expressivamente reativa, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Genestra, 2007; Salisbury & Bronas, 2015).

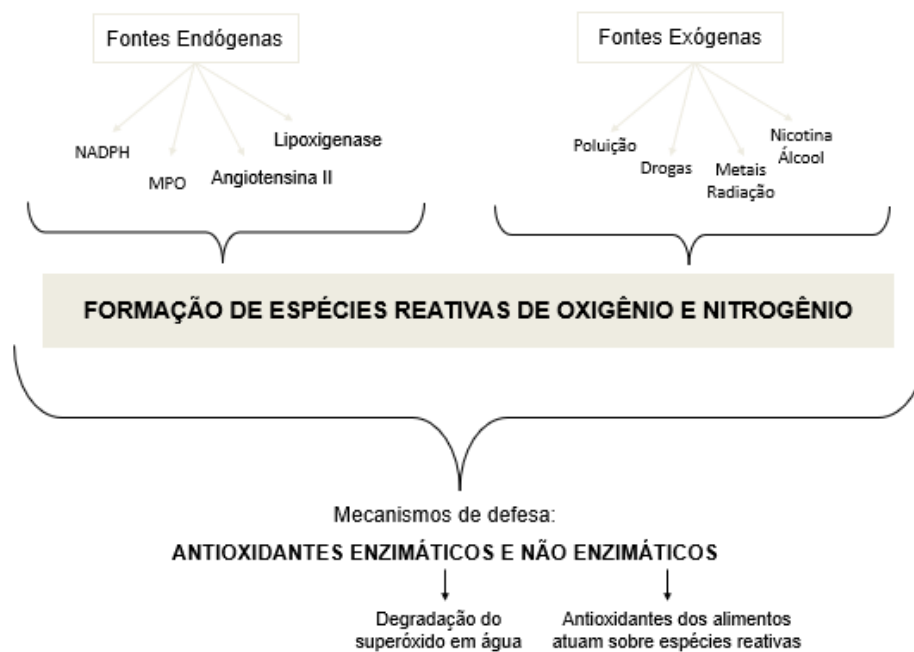
Por outro lado, as fontes exógenas de EROs envolvem a poluição do ar e da água, nicotina, álcool, metais pesados ou de transição, drogas, solventes industriais e radiação. Esses agentes são metabolizados e formam átomos e moléculas desemparelhados (Phaniendra, Jestadi & Periyasamy, 2015).

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico. Eles são necessários para que funções como a sinalização celular e a defesa contra microrganismos (MO) ocorram de maneira adequada. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (Barbosa *et al.*, 2010). Porém, a produção excessiva pode conduzir a lesões oxidativas e desenvolvimento de doenças crônicas (Venkataraman, Khurana & Tai, 2013).

O controle metabólico dessas espécies é feito por meio de dois sistemas antioxidantes integrados: o sistema endógeno enzimático, diretamente relacionado à degradação do superóxido em água, e o sistema exógeno não enzimático, no qual compostos antioxidantes presentes na alimentação atuam sobre as ERONs produzidas (Jones *et al.*, 1999; Alderton, Cooper & Knowles, 2001).

Os antioxidantes endógenos envolvem as enzimas antioxidantes primárias, sendo elas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). Conforme mencionado acima, o  $O_2$  é convertido pela SOD em  $H_2O_2$ , que, por sua vez, é decomposto em água e oxigênio pela CAT, impedindo a produção de radicais hidroxila. Além disso, a GPX converte peróxidos e radicais hidroxila em formas não tóxicas, pela oxidação da glutathione reduzida (GSH) em dissulfeto de glutathione, e depois reduzida a GSH, pela glutathione reductase. Outras enzimas antioxidantes importantes são a glutathione-S-transferase e a glicose-6-fosfato desidrogenase (Birben, 2012).

Por outro lado, os antioxidantes não enzimáticos são moléculas que interagem com as ERONs e cessam as reações em cadeia, desencadeadas pelos radicais livres (Wu, Kosten & Zhang, 2013). Os antioxidantes exógenos incluem o ácido ascórbico (vitamina C), que elimina o ânion radical hidroxila e superóxido, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), que está envolvido no controle da peroxidação lipídica e os antioxidantes fenólicos, que incluem os derivados do estilbeno (resveratrol, ácidos fenólicos, e flavonoides), lecitinas de óleo, selênio, zinco etc. (Pisoschi & Pop, 2015).



**Figura 2** Representação esquemática das fontes de ERONs e mecanismos de defesa envolvidos.

Portanto, o EO ocorre quando há um desequilíbrio entre a formação e a remoção de ERONs, devido a uma superprodução e/ou capacidade prejudicada de neutralizá-los ou de reparar os danos resultantes (Salisbury & Bronas, 2015). O aumento na produção das ERONs provoca a oxidação de moléculas, como proteínas, lipídios e DNA, causando prejuízo a vários órgãos e tecidos (Dubois-deruy *et al.*, 2020; Guimaraes *et al.*, 2020). Ensaio experimentais demonstram que portadores de DCNTs apresentam elevação dos níveis de biomarcadores que determinam a oxidação de proteínas (AOPP – Produtos proteicos de oxidação avançada) (Xu *et al.*, 2015) e peroxidação lipídica (TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (Pawluk *et al.*, 2017).

## 2.2. Doenças Crônicas Não Transmissíveis

O EO contínuo e o dano oxidativo podem levar à inflamação crônica, que por sua vez pode mediar a maioria das doenças crônicas, alterando a homeostase e

aumentando a probabilidade de doenças crônicas, como câncer, alterações cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes etc. Eles são provavelmente causados pela inflamação de baixo grau impulsionada pelo estresse, com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e genes codificados pela ativação do fator nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) (Sikora, Scapagnini & Barbagallo, 2010). A liberação dessas citocinas e ativação de fatores de transcrição, pode levar à expressão de diversos tipos de genes, incluindo fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas reguladoras do ciclo celular etc. (Reuter *et al.*, 2010).

As ERONs estão envolvidas em um amplo espectro de doenças, dentre elas, destacam-se:

- Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS): o EO está entre os mecanismos que levam a disfunção endotelial, alteração que desempenha um papel importante no desenvolvimento da HAS (Savoia *et al.*, 2011). O aumento das ERONS induz a ativação das células endoteliais, que passam a liberar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Essas moléculas promovem a proliferação e migração celular, alterando, dessa forma, a permeabilidade do endotélio e comprometendo o funcionamento correto e desencadeando o aumento da pressão entre os vasos (Park-Windhol & D'Amore, 2016).
- Cardiopatia: o aumento da biodisponibilidade de ERONS vascular leva ao crescimento, migração, deposição de colágeno e atividade alterada de metaloproteinases de matriz (MMP), fatores importantes na remodelação arterial em doenças cardiovasculares (Touyz, 2000; Griendling, Sorescu

& Ushio-Fukai, 2000). Nas células endoteliais, o EO induz apoptose e *aniokis* (“extravasamento” celular), levando à perda de células dessa região e conseqüente comprometimento da função endotelial. Além disso, como dito acima, o EO estimula a ativação de fatores de transcrição e genes pró-inflamatórios, regula positivamente a liberação das moléculas de adesão, estimula a produção de quimiocinas e aumenta o recrutamento de células inflamatórias. Essa cascata de alterações determina a inflamação e lesão vascular (Griendling, Sorescu & Ushio-Fukai, 2000; Touyz *et al.*, 2002).

- Diabetes Mellitus (DM): o EO crônico exerce forte influência sobre a resistência à insulina (RI) e DM do tipo 2 (DM2), tanto em relação à sua etiologia, quanto nas complicações da doença. A insulina atua no metabolismo da glicose, por meio da captação da molécula e gliconeogênese - processo onde precursores como lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos são convertidos em glicose - (Graham & Adler, 2014). O principal mecanismo pelo qual a insulina produz seus efeitos biológicos parte da sua ligação ao receptor transmembranar para insulina, do tipo tirosina quinase. Quando ativado, o receptor da insulina fosforila a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que, por sua vez, fosforila a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, gerando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. A ativação da PI3K estimula várias serina-quinases, incluindo quinase-1 fosfatidilinositol dependente, proteína quinase B, proteína quinase C e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Uma vez estimuladas, essas proteínas irão atuar em suas funções metabólicas (Graham & Adler, 2014).

Alterações nessas etapas de sinalização podem desencadear, por exemplo, o aumento da fosforilação dos substratos dos receptores da insulina, a degradação desses substratos e a atividade desordenada de fosfatases envolvidas no processo de sinalização (Kim, Wei & Sowers, 2008; Graham & Adler, 2014).

O EO participa da fosforilação, por exemplo, do complexo enzimático I $\kappa$ B quinase  $\beta$  (IKK), que atua na sinalização da insulina. Dessa forma, a atividade insulínica fica comprometida, desencadeando a elevação da glicemia e seus efeitos crônicos envolvem o DM2 (Schenk, Saberi & Olefsky, 2008; Gurzov *et al.*, 2014).

Além disso, o aumento das ERO reduz a produção de enzimas antioxidantes endógenas, como CAT, SOD e GPX. Variações nos níveis dessas enzimas tornam os tecidos ainda mais susceptíveis às consequências do EO, levando ao desenvolvimento de complicações associadas à doença (Matés, 2000; Das *et al.*, 2021).

- Obesidade: as ERONs desempenham um papel importante no desenvolvimento da obesidade e suas complicações metabólicas (Zielinska-Blizniewska *et al.*, 2019). Elas podem alterar a função de fatores reguladores da atividade mitocondrial, por meio da interação com moléculas de lipídios, proteínas e DNA mitocondriais, induzindo alterações na função da organela (Turrens & Boveris, 1980; Venditti, Stefano & Di Meo, 2013). Dessa forma, diversos constituintes da cadeia respiratória e enzimas do ciclo de Krebs podem ser inativados, levando à disfunção mitocondrial e consequente alteração no processo de produção

de energia, alterando a taxa metabólica basal e o gasto energético (Bhatti, Bhatti & Reddy, 2017).

Além disso, estudos demonstram que o EO altera a concentração de citocinas que participam do processo inflamatório (Hernández-Aguilera *et al.*, 2013; Cunarro *et al.*, 2018; Palikaras, Lionaki & Tavernarakis, 2018; Bouchez & Devin, 2019). Este, por sua vez, se associa ao aumento no número e tamanho de adipócitos, promovendo a lipogênese, estimulando a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (Palikaras, Lionaki & Tavernarakis, 2018; Bouchez & Devin, 2019).

Por fim, Fortuño *et al* (2010) demonstraram que as ERONs estão associadas a um aumento dos níveis de leptina. Além de outras funções, esse hormônio tem influência sobre o sistema imunológico, uma vez que favorece a proliferação de macrófagos e ativa a NADPH oxidase pela via PI3K. Também estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, favorecendo o processo inflamatório (Mangge *et al.*, 2013). Além disso, a leptina parece modular negativamente a produção de triptofano. A serotonina e a melatonina, que são derivados do triptofano, induzem a saciedade por diversos mecanismos (Perkins & Gilmore, 2006).

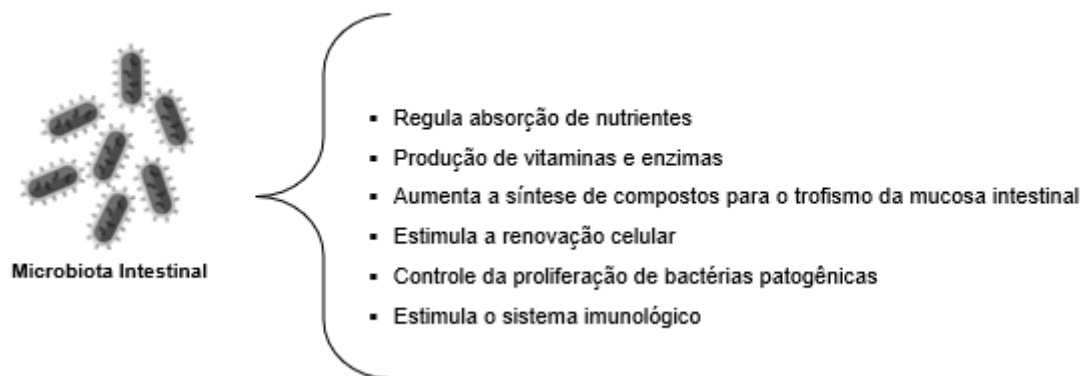
Diante disso, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de buscar estratégias para o controle e prevenção dos danos causados pelos radicais livres. Nesse sentido, agentes antioxidantes podem ser usados com estratégias para a prevenção e tratamento das doenças crônicas associadas ao EO. Sun *et al.*, (2017) demonstrou que a oleuropeína, composto fenólico abundante em folhas de oliveira, reduz a pressão arterial, citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e

IL-6) no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos. O mecanismo apontado como responsável, em parte, pelas respostas benéficas foi relacionado com a ativação da defesa antioxidante mediada pelo fator de transcrição Nrf-2 (Sun *et al.*, 2017). O Nrf-2 se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE) e promove a transcrição de genes que codificam as enzimas antioxidantes (Sykiotis e Bohmann, 2010). O efeito antioxidante induzido pela ativação do Nrf-2 pode atenuar a resposta inflamatória mediada pelo NF- $\kappa$ B (Cuadrado *et al.*, 2014), fator de transcrição envolvido na expressão de genes que codificam várias moléculas inflamatórias, tais como: IL-6, interleucina-8 (IL-8), TNF- $\alpha$  (Pamukcu *et al.*, 2011).

### **2.3. Microbiota intestinal**

No intestino humano existem trilhões de microrganismos (MO) que se associam, colonizando e formando a microbiota (Rigottier-Gois, 2013; Sonnenburg *et al.*, 2016). A MI desempenha um papel essencial na saúde do hospedeiro. Estudos demonstram que os MO presentes no intestino controlam a proliferação de bactérias patogênicas (Tralongo *et al.*, 2014; Tomasello *et al.*, 2014), estimulam o sistema imunológico, regulam a absorção de nutrientes (Kelder *et al.*, 2014), regulam o metabolismo e a fisiologia do hospedeiro (Falcinelli *et al.*, 2016), estimulam a produção de vitaminas e enzimas (Parekh, Balart & Johnson, 2015) e sintetizam compostos importantes para o trofismo da mucosa e renovação celular (Tralongo *et al.*, 2014).





**Figura 3** Representação esquemática das funções da MI em humanos. A microbiota desempenha as seguintes funções: estimula o sistema imunológico e a renovação celular, produz vitaminas e enzimas, aumenta a síntese de compostos úteis para o trofismo da mucosa e regula a absorção de nutrientes. Também regula o metabolismo do hospedeiro e controla a proliferação de bactérias patogênicas encontradas no trato gastrointestinal.

Qualquer alteração da eubiose intestinal ou na composição da MI é chamada de disbiose. A composição da MI depende de diversos fatores, incluindo a estrutura do epitélio intestinal, peristalse, mudanças na dieta, idade, fatores genéticos, temperatura, interação entre as espécies bacterianas, interação do sistema imunológico, uso de antibióticos ou drogas de radiação e quimioterapia, estresse ambiental, físico e, finalmente, psicológico (Lozupone *et al.*, 2012; Tralongo *et al.*, 2014; Parekh, Balart & Johnson, 2015).

Além disso, o EO induzido pelas ERONs, estimula a resposta inflamatória, desencadeando danos teciduais e aumento da permeabilidade intestinal (Rezaie, Parker & Abdollahi, 2007). O aumento da permeabilidade intestinal permite a passagem de lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas encontradas na membrana externa das bactérias gram-negativas, para a circulação sistêmica, induzindo um estado inflamatório sistêmico crônico (Tobias *et al.*, 1995; Lu *et al.*,

2008; Verhaar *et al.*, 2020). Esse efeito se dá pelo fato de que os LPS, por meio da ligação aos receptores Toll-like 4 (TLR4), que representam a primeira linha de defesa contra infecções por patógenos, podem levar à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (Wright *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 2008).

Em contrapartida, uma MI saudável pode reduzir o EO (Mottawea *et al.*, 2016). O equilíbrio do estado redox pode ser alcançado por meio de ligações endócrinas, imunológicas e humorais que ocorrem seguindo as vias de sinalização da MI para mitocôndrias. Em condições de disbiose, os MO patógenos tendem a controlar a atividade mitocondrial em favor da ativação do processo inflamatório. Os metabólitos produzidos pela MI comensal (ácidos graxo de cadeia curta e sais biliares), podem agir na redução das ERONs e no processo inflamatório (Mottawea *et al.*, 2016).

#### **2.4. Probióticos**

A busca por formas de promoção à saúde, controle e prevenção das DCNTs tem crescido mundialmente, uma vez que, a disseminação de conhecimento sobre a correlação existente entre as doenças metabólicas, alimentação e bem-estar tem sido amplamente comprovada e difundida (Jeske *et al.*, 2017).

A ingestão de alimentos ou suplementos probióticos é capaz de determinar impactos positivos sobre o organismo humano e melhorar o funcionamento do sistema imunológico, digestivo e metabólico (Swanson *et al.*, 2020), por meio de mecanismos anti-inflamatórios, antioxidantes e moduladores intestinais (Bouhafs *et al.*, 2015; Traina *et al.*, 2016).

De acordo com a Fundação das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) os probióticos são definidos como "microrganismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas, conferem um efeito de saúde ao hospedeiro" (FAO, 2001). Da mesma forma, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2018) adota o mesmo conceito em resolução que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.

O tratamento com probióticos envolve a modulação do sistema imunológico tanto em nível local como sistêmico e os efeitos benéficos incluem a redução da duração das infecções e a diminuição da suscetibilidade aos agentes patogênicos (Antoine, 2010).

Em 1985, Gilliland, Nelson & Maxwell, já demonstravam que o consumo de determinadas culturas de bactérias poderia atuar benéficamente no controle da dislipidemia. Os pesquisadores observaram que cepas como *Lactobacillus* e *Bifidobactérias*, poderiam atuar na absorção do colesterol, desconjugação dos ácidos biliares e conseqüente precipitação dessas moléculas. A partir disso, a pesquisa sobre lactobacilos redutores de colesterol desenvolveu-se rapidamente.

A modulação da dislipidemia pelos probióticos foi justificada pela capacidade de reduzir o colesterol por coprecipitação (Klaver & van der Meer, 1993), assimilação e absorção (Pereira & Gibson, 2002). Mazein *et al.* (2011) inferiram que os lactobacilos podem produzir hidrolase de sal biliar, que por sua vez, pode catalisar a desnaturação do sal biliar em aminoácidos e ácidos biliares livres. O sal biliar livre forma um complexo com o colesterol. Dessa forma, a precipitação

desse complexo pode reduzir o teor de colesterol. Ren *et al.* (2019) rastrearam lactobacilos com forte capacidade de redução do colesterol de alimentos fermentados tradicionais e descobriram que as bactérias do ácido lático selecionadas poderiam reduzir o teor de colesterol por meio de absorção pela membrana, coprecipitação e pela produção de enzimas responsáveis pela hidrólise de sais biliares, cujo principal efeito seria a hidrólise desses sais.

Ao mesmo tempo, o meio também pode interferir na precipitação do colesterol pelos probióticos. Young e colaboradores (1988) descobriram que as *Bifidobacterium* podem precipitar e remover o colesterol na presença de sais biliares em pH menor que 5,4. Dao Dong Pan (2011) apresentou resultados semelhantes, em que L. fermento SM-7 poderia coprecipitar e absorver 38,5% do colesterol no meio de cultura, quando o pH fora inferior a 6. A assimilação e a absorção envolvem a captura do colesterol pelos lactobacilos através da parede da membrana celular e do citoplasma, em um ambiente anaeróbico (Pan *et al.*, 2011).

Por outro lado, os probióticos podem mediar a desconjugação do colesterol por meio da intermediação da expressão de genes como o NPC1L1, CYP7A1, ABCG5 e ABCG8, relacionados ao metabolismo do colesterol (Repa *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002;).

Todo o processo de catabolismo, absorção e transporte do colesterol é mediado por genes e as enzimas, como a enzima HMGCR, que regula a síntese do colesterol, a quinase AMPK e o gene CYP7A1, que controla a conversão do colesterol em ácidos biliares (Yu *et al.*, 2002; Repa *et al.*, 2002; van der Veen *et al.*, 2005). Além disso, os genes NPC1L1 e ABCG5/G8 regulam a absorção e o

transporte do colesterol no intestino e o gene SREBP faz essa função no fígado (Zhao & Dahlman-Wright, 2010). As bactérias do ácido láctico podem regular direta ou indiretamente a expressão desses genes e enzimas, culminando em menor produção e absorção do colesterol (Briand *et al.*, 2009; Vrins *et al.*, 2009). Portanto, o consumo crônico e regular dos probióticos é um método promissor de tratamento e prevenção da hipercolesterolemia (Segawa *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2021).

## **2.5. Kefir**

O interesse pelo consumo do Kefir vem aumentando ano após ano (Prado *et al.*, 2015; McCarthy *et al.* 2017; Rasika *et al.*, 2020; Rutkowska *et al.*, 2022). Os grãos de kefir são formados por um agregado de bactérias, com predominância das bactérias ácido-láticas e acéticas, leveduras e fungos, envolvidos por uma matriz polissacarídica, denominada kefirano (Jianzhong *et al.*, 2009; Garrote *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015; Prado *et al.*, 2015). Esses MO realizam uma relação simbiótica e os produtos formados a partir de seus metabolismos servem como fonte energética para o crescimento microbiano saudável (Wang *et al.*, 2012; Hamet *et al.*, 2013). Devido a essa composição, o kefir é considerado um alimento probiótico, capaz de favorecer o desenvolvimento de bactérias benéficas na MI e, dessa forma, induzir melhora na saúde de seus consumidores (Lopitz *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2013; Farag *et al.*, 2020).

Os efeitos do kefir estão associados à presença dos MO probióticos e aos produtos metabólicos gerados durante o processo de fermentação (Rafie *et al.*, 2015; Sharifi *et al.*, 2017). Além disso, o kefir possui compostos altamente

antioxidantes, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e ácidos orgânicos (Garrote, Abraham & De Antoni, 2000; Sabokbar & Khodaiyan, 2016).

Estudos demonstram que os metabólitos do kefir atuam direta e indiretamente no organismo. Eles possibilitam a eliminação de radicais livres, apresentam capacidade quelante de íons ferrosos, atuam na redução da peroxidação lipídica e interferem na atividade enzimática antioxidante (Güven, Güven & Gülmez, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005; Stadie, Gultiz & Ehrmann, 2013; Alsayadi *et al.*, 2013; Fahmy & Ismail, 2015; Sunarti *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016; Ozcan *et al.*, 2019).

A ingestão de kefir aumenta a expressão de antioxidantes, como a GPX, e reduz a produção de espécies oxidantes, como o malonaldeído, envolvidos no EO (Liu *et al.*, 2005; Ozcan *et al.*, 2009). O kefir possibilita, ainda, a eliminação intracelular das ERONs e pode modular a produção de enzimas que favorecem a eliminação dessas espécies, como a SOD e CAT (Rafie *et al.*, 2015; Sharifi *et al.*, 2017).

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram tratados com grãos de kefir (0,3 mL/100g de peso), e os resultados após 60 dias demonstraram redução da pressão arterial e da frequência cardíaca. Os autores associaram a melhora da função endotelial vascular, após a ingestão de kefir, com a redução da produção de ERO na aorta e alta biodisponibilidade de ON intravascular. Dessa forma, foi possível verificar que o tratamento foi capaz de atenuar a disfunção vascular, associada ao EO, nos grandes vasos dos animais hipertensos (Friques *et al.*, 2015).

Em um ensaio clínico com pacientes diabéticos (n=60), suplementados com kefir (600 mL/dia) por 8 semanas, os pesquisadores observaram redução da glicemia de jejum e da hemoglobina glicosilada (HbA1C), comparado ao leite fermentado convencional. Esses resultados podem estar relacionados à atividade antioxidante dos probióticos sobre a modulação da MI, produzindo polipeptídios e peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), induzindo, dessa forma, a captação de glicose (Ostadrahimi *et al*, 2015).

A ingestão crônica do kefir também parece promover a apoptose de células cancerígenas medidas pelas ERO, por meio da menor secreção de fatores de crescimento tumoral como TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e Bcl2 (um inibidor de apoptose), e aumento na secreção de bax (um promotor de apoptose), levando, dessa forma, à indução da apoptose. A ação antiproliferativa de células cancerígenas pode estar relacionada à redução na secreção de TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , em células cancerígenas, e à presença de esfingomielinas no kefir, que aumentam a secreção da citocina antiproliferativa interferon- $\beta$  (Sharifi *et al.*, 2017).

Os diferentes substratos utilizados para o processo de fermentação do kefir atuam como prebióticos e favorecem o desenvolvimento da população dos MO por meio de uma relação simbiótica. Dessa forma, o probiótico e o prebiótico em conjunto produzem efeitos sinérgicos, ampliando os benefícios que esses alimentos podem produzir sobre a saúde do hospedeiro (Lopitz *et al.*, 2006).

O tipo de bebida à base de Kefir amplamente difundido é a láctea, resultante da fermentação do leite de vaca pelos grãos. Entretanto, o “leite vegetal” têm sido uma alternativa crescente e promissora para o desenvolvimento de produtos alimentícios e bebidas funcionais em todo o mundo. A alergia ao leite de vaca,

intolerância à lactose, atenção às calorias e não menos importante, a adesão às dietas veganas e vegetarianas, têm influenciado os consumidores na escolha de substitutos ao leite de vaca (McCarthy *et al.* 2017). As alternativas de produtos vegetais são uma tendência crescente, que pode servir como alternativa viável e de baixo custo (Mauro & Garcia, 2019).

## 2.6. Kefir de Água

O kefir de água é uma bebida fermentada levemente ácida, com um sabor único devido à sua textura viscosa, baixos níveis de álcool e outros compostos fermentados, originados da fermentação da sacarose das frutas com os grãos (Rajah *et al.*, 2021).

Os grãos de kefir de água, assim como o kefir de leite, têm em torno de 5 a 20 mm de diâmetro, com aspecto gelatinoso e irregular (Rosa *et al.*, 2017), e com teor de matéria seca de 10-14% (m/m). O primeiro passo para sua produção é a fermentação, que ocorre espontaneamente pela adição de grãos de kefir (6-31%), em um meio de sacarose (6-10%), com ou sem frutas secas ou extratos de frutas (Lynch *et al.*, 2021). A temperatura mais utilizada para a fermentação é de 21–25 °C, durante 24–72 horas. Após esse período, os grãos podem ser recuperados do líquido fermentado e reutilizados *ad infinitum*, colocando-os em uma nova solução de sacarose para uma nova fermentação (Verce, De Vuyst & Weckx, 2019).

O kefir de água possui uma alta diversidade microbiana, incluindo bactérias ácido-lácticas, principalmente espécies de *Lactobacillus* e bactérias ácido-acéticas do gênero *Acetobacter* (Laureys *et al.*, 2021). A composição da levedura, tanto *Saccharomyces* quanto não-*Saccharomyces*, são as principais espécies no kefir de água. No entanto, é impossível determinar suas espécies



específicas, pois essa composição varia de acordo com a origem geográfica dos grãos e as condições de fermentação e substratos (Lynch *et al.*, 2021).

Na fermentação, alguns compostos metabólicos são formados, o que contribui para os benefícios do kefir para a saúde. As espécies de levedura hidrolisam a sacarose produzindo glicose e frutose, que a levedura também utiliza para o seu metabolismo, leva à produção de etanol, ao mesmo tempo em que disponibiliza esses açúcares simples para o crescimento de bactérias. As espécies de bactérias lácticas encontradas no kefir de água podem produzir ácidos a partir da sacarose, como ácido láctico e ácido acético. Além disso, a sacarose é o substrato para a produção de exopolissacarídeo  $\alpha$ -glucano, que é um dextrano, o principal componente da estrutura do grão (Laureys *et al.*, 2021; Lynch *et al.*, 2021). Outro carboidrato formado a partir da sacarose é o manitol, que atua como fonte adicional de carbono para o crescimento do kefir. Além de hidrolisar a sacarose, a levedura fornece peptídeos e aminoácidos para o crescimento do kefir (Verce; De Vuyst & Weckx, 2019).

O kefir de água pode ser fonte de polifenóis, que podem estar associados à atividade antioxidante dessa bebida fermentada. No entanto, a quantidade de polifenóis pode depender do tipo de fruta utilizada, do grau de maturação e das práticas de cultivo da fruta utilizada (Randazzo *et al.*, 2016).

O consumo de kefir de água está cada vez mais difundido, especialmente na América do Sul, Europa Oriental e Rússia. O kefir de água pode fornecer uma gama diversificada de substratos, aromas e sabores, que dependem das diferentes formas de açúcar, frutas, vegetais e outros ingredientes utilizados em seu preparo (Randazzo *et al.*, 2016).

## 2.7. Coco

O *Cocos nucifera* é uma importante árvore frutífera cultivada no mundo todo, que fornece alimento para milhões de pessoas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Mandal *et al.*, 2011). Por milhares de anos os produtos do coco têm sido usados na medicina popular indiana. Na medicina ayurvédica, o óleo, o “leite”, o creme e a água do coco são usados para tratar a perda de cabelo, queimaduras e problemas cardíacos (Mandal *et al.*, 2011). A fruta fornece um bom valor nutricional pois é rico em vitaminas B e perfil equilibrado de aminoácidos (Srinivasan *et al.* 1964).

O coco também contém proteínas com perfil de aminoácidos moderadamente bem balanceado em termos de valor nutritivo, com prevalência da metionina, isoleucina, treonina, triptofano e L-arginina (Gunetileke & Laurentius, 1974; Gonzales & Tanchuco, 1977; Rasyid, Manullang, & Hansen, 1992; Kwon, Park, & Rhee, 1996). A proteína de coco favoreceu efeito antidiabético em animais experimentais e efeito cardioprotetor em ratos tratados com álcool e isoproterenol. O principal fator responsável por esses efeitos foi atribuído ao perfil de aminoácidos presente no coco (Salil *et al.* 2011).

A fruta também contém ácido láurico como componente funcional, o que pode promover o desenvolvimento de funções cerebrais, estimular as defesas do sistema imunológico e manter a elasticidade dos vasos sanguíneos (Seow & Gwee 1997; Sethi *et al.* 2016).

Além disso, o coco é fonte de compostos fenólicos, taninos, leucoantocianinas, flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides e saponinas (Eyres *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Sheela e colaboradores (2017) verificou o potencial

efeito antidiabético do coco, revelando que ele se mostra como nutracêutico eficaz e emergente, que tem a possibilidade de ser utilizado como agente protetor contra as complicações secundárias das DCNTs, como no diabetes, na retinopatia diabética, nefropatia, cardiomiopatia e neuropatia.

Além disso, é evidenciado o papel dos ácidos graxos de cadeia média (AGCM) presentes no coco sobre a modulação do metabolismo lipídico (Kochikuzhyil *et al.*, 2010). Kochikuzhyil *et al.* (2010) observaram que animais que consumiram óleo de coco tiveram redução significativa nos níveis de colesterol total e LDLc, melhora da atividade de enzimas antioxidantes e maior tolerância à glicose.

O leite de coco é comumente fabricado a partir de polpa de coco ralada e pode ser preparado em casa a partir da carne ralada apertando com a mão, enquanto em escala industrial ou comercial emprega-se a prensa de rosca ou hidráulica para extrair o leite. Trata-se de uma emulsão de óleo em água, estabilizada por algumas proteínas existentes na fase aquosa. É geralmente extraído da carne ralada do coco depois de prensado ou espremido com ou sem adição de água (Tansakul & Chaisawang, 2006).

## **2.8. *Caenorhabditis Elegans***

Em 1965, Sydney Brenner escolheu o nematoide *C. Elegans* como um organismo modelo para estudar seu desenvolvimento e comportamento (Brenner, 1973). Este nematoide do solo oferece potencial interessante para análise genética, em parte devido ao seu ciclo de vida rápido (20 a 25 dias), tamanho pequeno (adulto de 1,5 mm de comprimento) e facilidade de cultivo em laboratório. A progênie (300-350) produzida por um único animal, e o modo natural de endogamia do *C. Elegans*, pelo hermafrodita auto-fecundante,

combinado com a capacidade de cruzar hermafroditas com machos, oferecia conveniências ao pesquisador que até os dias de hoje os tornam atraentes. Além disso, características como seu pequeno genoma (apenas 20 vezes o da *E. coli*) e sua simplicidade anatômica ( $\pm 1000$  células), viabiliza sua utilização nas pesquisas (Riddle *et al.*, 1997).

A transparência do corpo, o número e a constância da posição da célula de indivíduo para indivíduo, são vantagens oferecidas por esse organismo para o estudo do desenvolvimento. Trata-se uma espécie interessante para observação com microscopia de contraste de interferência diferencial, e a maioria de suas células são acessíveis à microcirurgia a laser (Riddle *et al.*, 1997).

O embrião hermafrodita eclode com 558 núcleos e se torna uma larva de primeiro estágio (L1). Os animais começam a se alimentar e se desenvolvem através de quatro estágios larvares (L1-L4). O estágio L1 dura aproximadamente 16 horas de duração e os demais estágios duram em torno de 12 horas. Aproximadamente 12 horas após a muda L4, os hermafroditas adultos começam a produzir progênie por um período de dois a três dias, até que tenham utilizado todo o seu esperma autoproduzido. Uma progênie adicional pode ser gerada se o hermafrodita depletado de esperma se acasalar com um macho. Após o período reprodutivo, os hermafroditas podem viver várias semanas antes de morrer de senescência (Corsi *et al.*, 2015). Seu cultivo e manuseio em laboratório é fácil e de custo baixo, utilizando meio ágar alimentado com *Escherichia coli* (*E. Coli*) (OP50) (Corsi *et al.*, 2015).

Este modelo permite estudar diversas doenças, pois apresenta correspondentes moleculares similares aos envolvidos em determinadas doenças humanas. Dessa forma, as interações poderão ser estudadas, detalhadas, compreendidas

e manipuladas (Kaletta & Hengartner, 2006). Além disso, do ponto de vista toxicológico, *C. elegans* é sensível a uma ampla gama de substâncias, incluindo metais pesados, fosfatos orgânicos e pesticidas (Schouest *et al.*, 2009; Wollenhaupt *et al.*, 2014), assim como de componentes farmacêuticos e fitoquímicos (Wollenhaupt *et al.*, 2014).

Entre os parâmetros relevantes para estudo deste nematoide estão a mortalidade, a longevidade, a resposta de movimentação, a implacabilidade na alimentação, no crescimento e na reprodução. Estes recursos têm contribuído para compreender inúmeros processos biológicos comuns a todos os animais, como o metabolismo xenobiótico e o envelhecimento (Dengg & Van Meel, 2004).

Dessa forma, o *C. elegans* demonstra ser uma ferramenta rápida, barata e eficaz no estudo de diversos tipos de doenças (Lapierre & Hansen, 2012).

## **2.9. Hipótese**

Diante das evidências apresentadas, acredita-se que um alimento probiótico à base de leite de coco, fermentado por grãos de Kefir, pode ser capaz de produzir efeitos benéficos contra os mecanismos envolvidos no EO. Ressalta-se que apesar dos estudos mostrarem que o kefir e o coco podem oferecer benefícios à saúde, não foram encontrados trabalhos que utilizam a bebida à base de coco como substrato para fermentação pelo kefir de água tampouco sua avaliação modelo *in vivo* *C. elegans*.

Portanto, a hipótese do presente estudo é a de que a obtenção de bebida simbiótica de matriz à base de leite de coco, fermentada pelos grãos de kefir, comprovada pela atividade antioxidante e valor de pH, produzirá efeito preventivo contra o EO.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Obter produto à base de leite de coco fermentado pelos grãos de kefir com melhor potencial antioxidante, considerando diferentes concentrações de inóculo de kefir, concentrações de leite de coco e temperaturas de fermentação, e avaliar seu potencial antioxidante *in vitro*, e *in vivo*, utilizando o modelo *C. elegans*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter produtos fermentados por grãos de kefir em matriz não láctea à base de leite de coco com diferentes concentrações do leite com partes sobre volume de água de coco (p:v) (1:3; 1:6; 1:9), de inóculo de Kefir (2%, 5% e 8%) e diferentes temperaturas (30°C, 37°C e 43°C) de fermentação;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos diferentes produtos obtidos e determinar o produto não lácteo com melhor perfil (ABTS, DPPH, FRAP);
- ✓ Avaliar a medida de pH dos diferentes produtos obtidos e determinar o produto não lácteo com melhor resultado;
- ✓ Caracterizar o produto de melhor perfil em relação à:
  - Análise da composição centesimal (umidade, carboidratos, lipídios, proteínas e cinzas);
  - Avaliação da acidez titulável;
  - Avaliação microbiológica;
  - Determinação do teor de polifenóis totais;

- Avaliação dos efeitos do tratamento com bebida à base de leite de coco na sobrevivência do *C. elegans*, sobre a formação de EROs e em condições de estresse (térmico e químico);
- Avaliar a toxicidade do produto à base de leite de coco e seu respectivo produto fermentado com melhor atividade antioxidante *in vitro* utilizando *C. elegans* como organismo-teste.

## 4. Material e métodos

### 4.1. Material

Os grãos de kefir foram provenientes da Universidade Federal de Viçosa – UFV e os cocos *in natura* foram adquiridas em comércio local, no ano de 2021.

### 4.2. Preparo do leite de coco

A polpa de coco madura foi higienizada com água, ralada e homogeneizada. Posteriormente foi misturada com água de coco e triturada em processador de alimentos (Vegan Milk Machine – Polishop®, BR) por 2 minutos. A suspensão foi filtrada e os resíduos sólidos, descartados. Após a obtenção do leite de coco, a amostra seguiu para armazenamento em frascos de vidro previamente pasteurizados a 95°C, por 5 minutos (Mauro & Garcia, 2019; Siriphanich *et al.* 2011).

### 4.3. Preparo dos produtos fermentados

A escolha dos valores reais aplicados para definir as concentrações de kefir, leite de coco, bem como das temperaturas de fermentação, foi realizada de acordo com a literatura. O leite de coco foi diluído em água de coco, nas proporções de 1:3, 1:6 e 1:9 (p/v), de acordo com Mauro & Garcia (2019). Para a concentração

dos grãos de kefir, de forma geral, o uso do probiótico ocorre com as concentrações de grãos variando entre 2% e 10% (de Almeida Silva *et al.*, 2020; Friques *et al.*, 2015; Hatmal *et al.*, 2018; Koh *et al.*, 2018; Otles & Cagindi, 2003). Os grãos foram mantidos sob temperatura de 25°C, 30°C e 35°C para fermentação (Tobajas *et al.* 2007), durante 24h (Tobajas *et al.* 2007).

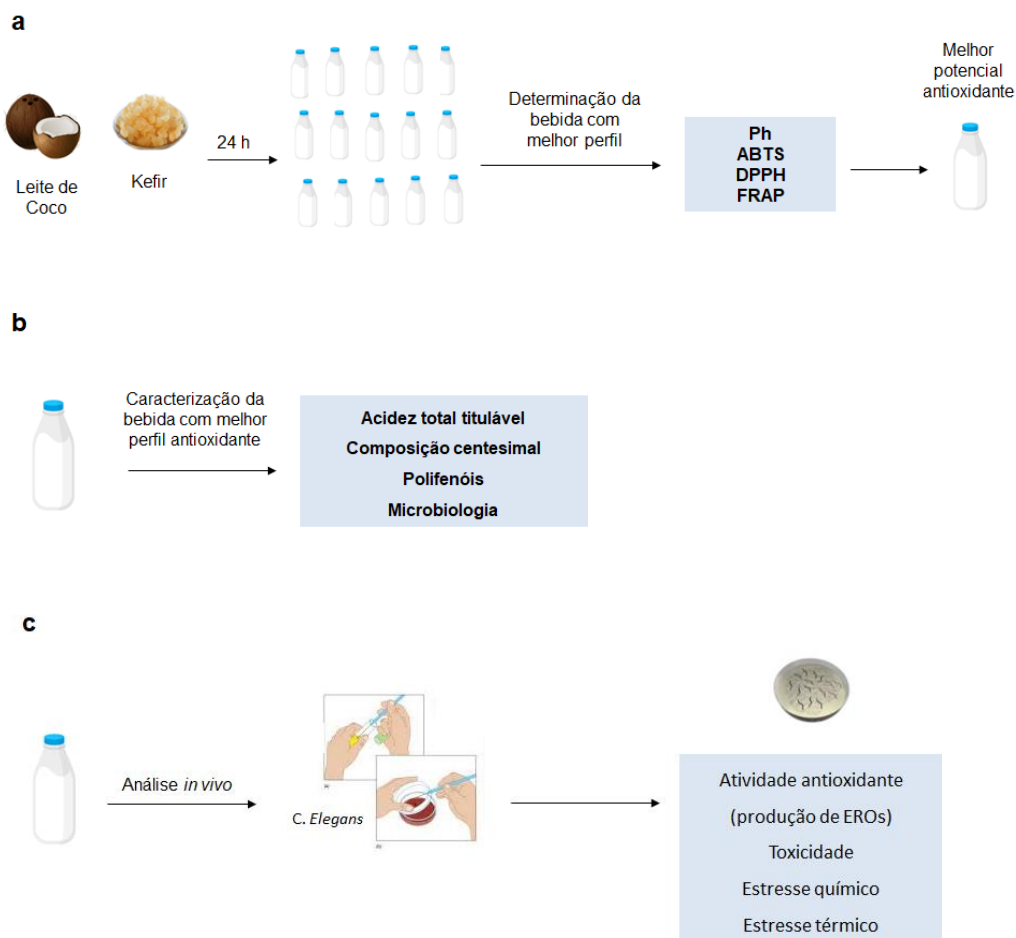
#### **4.4. Delineamento Experimental**

Levando em consideração as diferentes concentrações de leite de coco (Mauro & Garcia, 2019), grãos de kefir e temperatura de fermentação – nas concentrações citadas acima - (de Almeida Silva *et al.*, 2020; Friques *et al.*, 2015; Hatmal *et al.*, 2018; Koh *et al.*, 2018; Otles & Cagindi, 2003), foram produzidas 15 bebidas. As bebidas foram utilizadas para a fermentação do kefir e, 24 horas depois, os produtos foram recolhidos, nomeados e armazenados (Tobajas *et al.* 2007).

As 15 bebidas foram analisadas quanto ao potencial antioxidante. Foram feitas análises de Ph, sequestro do radical livre (2,2-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS), atividade de eliminação do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (FRAP) (Figura 4a). Os resultados foram comparados e a bebida com melhor perfil foi selecionada e caracterizada quanto à acidez total titulável, composição centesimal, teor de polifenóis totais e microbiologia (Figura 4b).

Por fim, a bebida com melhor perfil antioxidante foi testada *in vivo*, no modelo *C. Elegans*, quanto à atividade antioxidante, toxicidade e resistência aos estresses químico e térmico (Figura 4c).





**Figura 4** Representação esquemática do delineamento experimental do trabalho. **a.** Preparo das bebidas à base de leite de leite, fermentadas com kefir. **b.** Caracterização *in vitro* da bebida com melhor potencial antioxidante. **c.** Análises *in vivo*, utilizando o modelo *C. Elegans*.

#### 4.5. Atividade antioxidante *in vitro*: ABTS, DPPH e FRAP

A atividade antioxidante de cada uma das bebidas fermentadas foi determinada pelo método de ABTS, de acordo com Re *et al.* (1999) modificado. Inicialmente foi preparada a solução de ABTS<sup>+</sup> por meio da reação entre a solução de ABTS 7,0 mM (Sigma-Aldrich, EUA) com a solução de persulfato de potássio 2,45 mM. A solução preparada foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante 16 horas antes do uso para a formação do radical ABTS e, em seguida, armazenada a 4°C até o momento das análises. Para as análises, a solução foi mantida em

temperatura ambiente e posteriormente diluída (1250 µl de solução-mãe em 50 ml de etanol:água 50%) até atingir um valor de absorvância de  $1,10 \pm 0,02$  a 734nm (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Em seguida, para obtenção dos resultados, foi elaborada uma curva padrão para cada bebida, sendo elas diluídas com água deionizada, em 5 ou mais concentrações decrescentes que variavam de 45 a 0,5% (v/v) da amostra original. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µl de cada diluição e 270 µl da solução de ABTS<sup>+</sup>. O branco foi realizado com 30 µl de etanol e 270 µl da solução de ABTS<sup>+</sup>. Após 6 minutos de reação no escuro, a leitura foi realizada a 734nm, em um leitor de microplacas (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A curva para cada ensaio foi aceita tendo como critério o valor de  $R^2 > 0,98$ . Os resultados foram expressos como IC<sub>50</sub> (concentração capaz de reduzir 50% de radicais livres) e calculados usando uma curva de calibração na faixa linear, plotando a concentração final da bebida *versus* o índice de redução correspondente. A atividade de eliminação radical foi calculada usando a equação:

$$IR (\%) = [(AbsB - AbsT) / (AbsB)] \times 100$$

Sendo: IR o índice de redução dos radicais de ABTS; AbsB é a absorvância média dos brancos; AbsT é a absorvância do teste (Guidoni *et al.*, 2019).

A análise de DPPH foi avaliada pelo branqueamento da solução de metanol púrpura do radical livre DPPH de acordo com Scherer & Godoy (2009). Em uma microplaca de 96 poços, 22µl da amostra foram misturados com 200µl de uma solução de DPPH (25mg/L). Após 60 min no escuro à temperatura ambiente, a absorvância foi determinada a 515 nm (Multi-ModeMicroplate Reader, Filter Max

F5, Molecular Devices Spectra, USA). A atividade de eliminação de radicais de DPPH foi calculada usando a equação:

$$\text{IR (\%)} = [(\text{AbsB} - \text{AbsT}) / (\text{AbsB})] \times 100$$

Sendo: IR o índice de redução dos radicais de DPPH; AbsB é a absorbância média dos brancos; AbsT é a absorbância do teste.

Os resultados foram expressos como IC<sub>50</sub> (concentração capaz de reduzir 50% de radicais livres) e calculados usando uma curva de calibração na faixa linear, plotando a concentração final da bebida versus o índice de redução correspondente. A curva para determinação do IC<sub>50</sub> foi aceita tendo como critério o valor de R<sup>2</sup> > 0,98.

O ensaio FRAP foi realizado de acordo com o método descrito por Benzie e Strain (1996). A composição da solução de FRAP foi obtida a partir de uma mistura na proporção 10:1:1 dos reagentes: solução de acetato de sódio 0,3 M (pH 3,6), solução de cloreto férrico 20 mM e solução de 2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazine (TPTZ) 10 mM, misturadas no momento do preparo das microplacas. Para o ensaio, foram realizadas diferentes diluições da amostra e colocadas em microplaca. A solução de FRAP foi adicionada e incubada por 10 min, no escuro, e então a absorbância foi lida a 595 nm usando um leitor de microplaca ELISA. O ensaio foi realizado em triplicata e a capacidade de eliminação de radicais FRAP das amostras foram calculadas usando a seguinte equação:

$$\text{Índice de redução percentual (\%)} = [(\text{AbsB} - \text{AbsT}) / \text{AbsB}] \times 100$$

Onde: AbsB é a absorbância do controle e AbsT é a absorbância na presença da amostra.

#### **4.6. Determinação do pH**

O valor do pH de cada uma das bebidas foi medido por meio de pHmetro digital (KASVI, K39-1014B). O eletrodo foi imerso diretamente na amostra e a leitura foi realizada após a estabilização do valor aferido (*Association of Official Agricultural Chemists - AOAC*, 2000). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

#### **4.7. Caracterização da bebida de leite de coco fermentada (LCK) selecionada e da bebida de leite de coco sem fermentar (LCSF)**

##### **4.7.1. Determinação da acidez titulável**

A acidez total titulável foi determinada por meio da titulação da bebida com solução de hidróxido de sódio 0,01M até obtenção de coloração rósea, seguindo o método nº 942.15 da AOAC (1997).

##### **4.7.2. Determinação da composição centesimal**

Umidade, lipídios, proteínas, carboidratos e cinzas foram avaliados na análise de composição centesimal de acordo com AOAC, 2000. A determinação da umidade foi feita pelo método de secagem em estufa a 105°C, até peso constante; os lipídeos pelo método de extração com éter de petróleo em aparelho do tipo Soxhlet; o teor de proteínas pelo método de Kjeldahl, utilizando como fator de conversão 5,7; as cinzas por incineração em mufla a 550°C. Os carboidratos foram determinados por diferença entre o total de amostra (100%).

##### **4.7.3. Análise microbiológica**

As amostras foram diluídas utilizando solução salina. Em seguida foram plaqueadas em ágar para identificação e contagem das colônias nos meios de

cultivo *Man Rogosa e Sharpe agar* (MRS, Sigma Aldrich, EUA) para *Lactobacillus sp*; *Plate Count Agar* (PCA, Biolog®, EUA) para contagem bacteriana total; *Ágar Sabouraud Dextrose* (Kasvi®, PR, BR) para contagem de leveduras. As placas de MRS ficaram a 37 °C por 48 a 72h. As placas PCA e o *Saborraud* foram incubadas a 37°C. A contagem das colônias foi realizada a partir das placas com crescimento bacteriano entre 30 e 300 unidades formadoras de colônia (UFC) por placa para o meio *plate count agar* (PCA), e entre 15 e 150 UFC/placa para os demais meios (Yu, Z. *et al.*, 2019). Os resultados foram expressos em UFC por ml de amostra (UFC/ml).

#### **4.7.4. Polifenóis totais**

A quantificação de polifenóis totais foi realizada a partir da solução composta por 30µL do extrato de polifenol e 75µl da solução de Folin (Dinâmica, SP, Brasil) (1:1). Após 5 minutos de reação, foram adicionados 75µl de solução de carbonato de sódio (Dinâmica, SP, BR) (20%) e o volume foi completado com água deionizada até 600µl. A solução foi deixada em repouso por 30 minutos e posteriormente foi realizada a leitura a 750nm (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A curva padrão do ácido gálico foi elaborada a partir da plotagem das absorbâncias geradas pelo ácido gálico (Sigma, EUA), em 9 concentrações variando de 3,0 a 40,0 µg/ml. A partir da equação da reta obtida na curva padrão (parâmetros de ajuste:  $y = 230,51x - 11,37$ ,  $R^2 = 0,997$ ,  $R^2 = 0,997$ ), foi realizado o cálculo do teor de polifenóis totais, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por ml de amostra (mg/ml).

#### **4.7.5. Ensaios *in vivo***

#### **4.7.5.1. Cepas de *C. elegans*, manutenção e sincronização**

Os ensaios *in vivo* foram realizados em cepas de *C. elegans* N2, do tipo selvagem, cedidas pelo Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

A manutenção das cepas foi realizada em placas de meio de crescimento para nematoides (NGM), semeadas com *Escherichia coli* OP50 e encubadas à 20°C (Brenner, 1974). A sincronização para obtenção dos vermes no primeiro estágio larval (L1) foi realizada a partir da liberação dos ovos dos nematoides grávidos (Augusti *et al.*, 2017; Rangsinth *et al.*, 2019). Para isso, os nematoides foram coletados em tubos, aos quais foi adicionada a solução de lise contendo NaOCl (Neon, SP, Brasil) 1% e NaOH (Neon, SP, BR) 0,25 M. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 6 minutos e em seguida foram levados à centrifugação por 3 minutos a 2173g. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com água estéril e centrifugado por 3 minutos a 2173g. Após descartar a água, os ovos sedimentados foram ressuspensos em solução tampão M9, 0,02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,04 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,08 M NaCl, (Neon, SP, Brasil) e 0,001 M de  $\text{MgSO}_4$  (Neon, SP, Brasil) (Rangsinth *et al.*, 2019), colocados em placas contendo o meio NGM sem adição de bactérias e levados para incubação durante o período de 16 horas para eclosão dos ovos e liberação das larvas (Charão *et al.*, 2015; Augusti *et al.*, 2017; Rangsinth *et al.*, 2019).

#### **4.7.5.2. Tratamento**

Os vermes previamente sincronizados foram tratados com a bebida de leite de coco fermentada com kefir (LCK) selecionada, ou bebida não fermentada (LCSF)

e mantidos sob agitação durante 30 minutos, à temperatura de 20 °C. Os vermes tratados com água destilada autoclavada foram usados como grupo controle. Após a exposição, os vermes foram lavados 3 vezes com NaCl a 0,5% para remover o tratamento e, em seguida, foram transferidos para placas NGM, inoculada com a bactéria *E. coli* OP50 para os ensaios posteriores (Augusti *et al.*, 2017).

#### **4.7.5.3. Avaliação de mortalidade**

As placas foram mantidas em incubadora (B.O.D) (TECNAL,TE-371, São Paulo, BR), à temperatura de 20°C, durante 24h. Após o período de incubação foi realizada a contagem dos vermes sobreviventes em cada placa para determinar o efeito das amostras sobre a taxa de mortalidade (Charão *et al.*, 2015; Augusti *et al.*, 2017), utilizando microscópio ótico (Nikon, Eclipse e200, JP).

#### **4.7.5.4. Análise do desenvolvimento**

O desenvolvimento foi avaliado 48h após o tratamento por meio da medida de área corporal ( $\mu^2$ ) dos vermes adultos em microscópio (Leica, DMLS, Alemanha). As placas contendo os vermes foram lavadas com água autoclavada e estes foram transferidos para tubos plásticos, os quais foram mantidos em repouso para aguardar o período de decantação dos vermes. Após esse período, o sobrenadante foi descartado para retirada total das bactérias. O processo foi repetido até obtenção de uma solução límpida. Em seguida, 15  $\mu$ l da solução com vermes foram depositados sobre uma lâmina coberta por agarose e adicionados 30  $\mu$ l de levamisol 2,25%. Os vermes foram fotografados para terem o contorno corporal medido (10 medições por cada placa), realizado

manualmente com auxílio do software AxioVision versão 4.8.2 (Charão *et al.*, 2015; Augusti *et al.*, 2017).

#### **4.7.5.5. Medição de EROs intracelular**

A sonda fluorescente não polar diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) foi empregada para determinar EROs citoplasmáticos *in vivo*, em vermes de em estágio larval L4, após tratamento prévio com o LCK e controle (LCSF), conforme descrito por Yoon *et al* (2018). Os vermes foram transferidos para uma placa de 96 poços (~20 vermes por poço) contendo 50 µM DCFH-DA. A intensidade da fluorescência foi posteriormente medida usando o espectrofotômetro SpectraMax® 190 (Excitation-485, Emission-535).

#### **4.7.5.6. Ensaio para estresse**

##### **4.7.5.6.1. Estresse Térmico**

Cerca de 60 vermes de cada grupo foram ser transferidos para três novas placas contendo 20 vermes em cada e mantidos a 37°C em estufa. A sobrevivência foi verificada em 30 minutos, 2h, 4h, 6h e 8 horas, usando microscópio. Os animais foram considerados mortos quando não realizavam mais batimentos faríngeo. A análise de sobrevivência foi calculada como a porcentagem de animais sobreviventes na população (adaptado de Bonomo *et al*, 2014 e Feng *et al*, 2015).

##### **4.7.5.6.2. Estresse Químico**

Para testar se o tratamento com o leite de coco fermentado com kefir promovia aumento na resistência ao estresse oxidativo, os animais tratados ou não com a bebida foram transferidos para uma solução de tampão M9 contendo 7,5mM de



tert-butil Hidroperóxido (t-BOOH), um análogo do peróxido de hidrogênio, mais estável em meio líquido. Cada experimento foi realizado em placas de 96 poços, onde 30 vermes por grupo foram colocados em 3 poços com uma média de 10 vermes por poço. A viabilidade dos animais foi analisada após 30 minutos, 2h, 4h e 6 horas, usando microscópio óptico para contar o número de animais vivos e mortos (adaptado de Bonomo *et al*, 2014). Os animais foram considerados mortos quando não realizavam mais batimentos faríngeo. A análise de sobrevivência foi calculada como a porcentagem de animais sobreviventes na população.

#### **4.8. Análise Estatística**

Para comparação de duas médias foi realizado o Teste t. Os resultados com o *C. elegans* foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), ajustado para múltiplas comparações, e a significância da diferença entre as médias foi determinada por teste post-hoc de Tukey. Os resultados foram expressos como média, mais ou menos o erro padrão da média (E.P.M.), com significância aceita acima de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### **5. Resultados**

#### **5.1. Caracterização da bebida à base de leite de coco fermentada pelos grãos de kefir selecionada**

##### **5.1.1. Análise da Composição Centesimal**

A tabela 1 apresenta os resultados referentes à análise centesimal das bebidas de leite de coco fermentadas ou não com kefir, e quantidade de polifenóis totais encontrados na bebida fermentada. Para o teor de umidade e cinzas houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Outra mudança encontrada foi com relação ao teor

de carboidratos. A bebida LCK apresentou valor significativamente menor que a bebida LCSF. Para as demais análises não houve diferença estatística.

**Tabela 1.** Média e desvio padrão da composição centesimal da bebida de leite de coco não fermentado (LCSF) e leite de coco fermentado com kefir (LCK) e polifenóis totais (EAG Ác Gálico/ml) do LCK.

Análise (%)	LCSF	LCK
Umidade	84,30±0,1355	86,62±1,101*
Carboidratos	9,43±0,1929	6,77±0,3349*
Lipídeos	4,39±0,1816	4,45±0,3138
Proteínas	1,19±0,1168	1,37±0,8582
Cinzas	0,69±0,2081	0,79±0,5696
Polifenóis totais (mg/ml)		621,69 ± 1,69

\* $p < 0,05$  vs leite de coco não fermentado. EAG, Equivalente grama

### 5.1.2. Análise microbiológica, pH e acidez total titulável

A análise microbiológica dos produtos mostrou que a bebida LCK apresentou maior crescimento de MO (CBT, BAL e LEV) comparada à bebida LCSF ( $p < 0,05$ ) (tabela 2). O pH e o valor da acidez titulável também apresentaram mudanças na bebida fermentada comparada à bebida não fermentada.

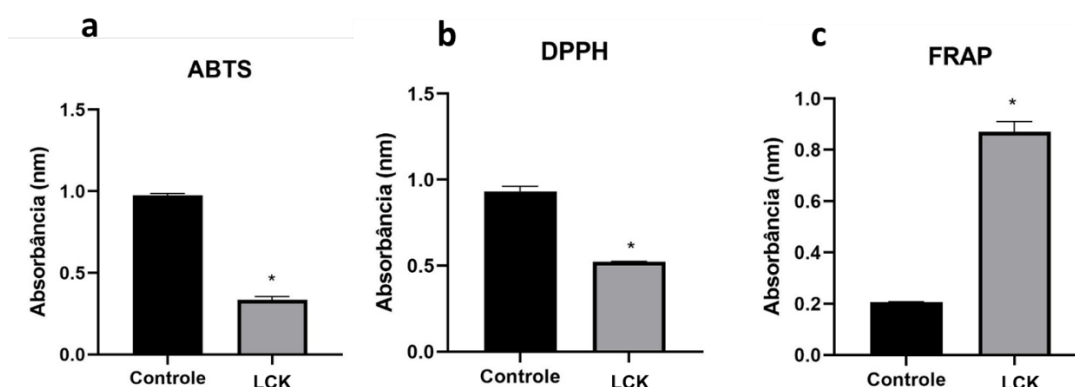
**Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão da quantidade de MO (UFC.ml<sup>-1</sup>), pH e acidez total titulável das bebidas de leite de coco fermentado (LCK) ou não (LCSF), nos diferentes meios de cultura.

Análise	LCSF	LCK
CBT	1,19x10 <sup>3</sup> ± 0,59	>800*
BAL	<10	>800*
LEV	<10	>800*
pH	5,773 ± 0,05239	4,553 ± 0,04055*
Acidez	0,1312 ± 0,01	0,2646 ± 0,01*

CTB, contagem bacteriana total; BAL, bactérias ácido lácticas; LEV, leveduras.

### 5.1.3. Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante da amostra foi dosada pelas metodologias de ABTS, DPPH e FRAP. A capacidade de inibição tanto do ABTS, quanto do DPPH e FRAP pela bebida probiótica vegetal à base de coco (LCK), em relação ao controle, apresentou diferença estatística.



**Figura 1. a.** Avaliação da inibição do radical ABTS pela bebida fermentada à base de coco (LCK) em comparação com o Controle sobre a taxa de absorvância (nm). **b.** Avaliação do sequestro do radical DPPH pela bebida fermentada à base de coco (LCK) em comparação com o Controle sobre a taxa de absorvância (nm). **c.** Avaliação da neutralização do radical FRAP pela bebida fermentada à base de coco (LCK) em comparação com o Controle sobre a taxa de absorvância (nm). Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM \* $p < 0,001$  em comparação com o grupo Controle.

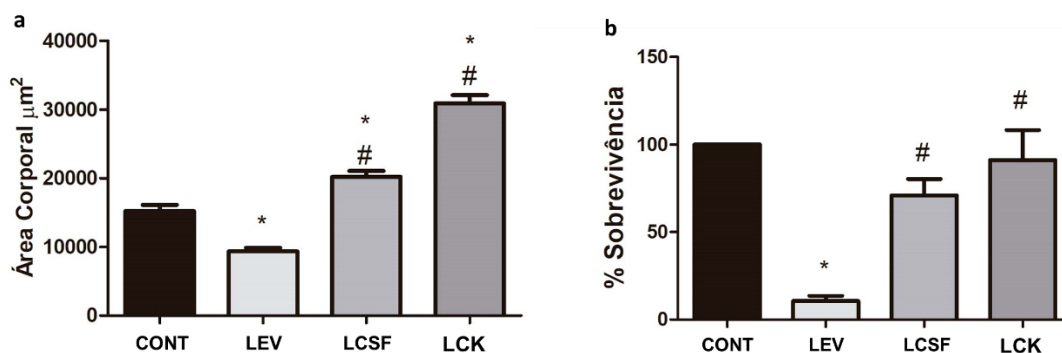
## 5.2. Análise *in vivo* utilizando o modelo experimental *C. Elegans*

### 5.2.1. Toxicidade

Os resultados demonstraram que, para a análise de sobrevivência, não houve diferença estatística entre os grupos controle, leite de coco sem fermentar e leite de coco fermentado, como demonstrado na Figura 2. O controle positivo (LEV)

demonstrou diferença estatística entre todos os grupos, por ser um controle indutor de mortalidade, reduzindo a taxa de sobrevivência dos vermes.

Para analisar o desenvolvimento dos vermes, foi realizada a medição corporal através de imagens feitas em estereomicroscópio e medidos em programa AxionVision. O estudo demonstrou que, os vermes que passaram pelo tratamento com o leite de coco fermentado (LCK), apresentaram uma diferença significativa no aumento da medida corporal, em comparação com os grupos controle (CONT), controle positivo (LEV) e leite de coco sem fermentar (LCSF). O grupo controle positivo (LEV) apresentou diferença estatística entre todos os grupos, por ser um controle tóxico ao organismo, reduzindo assim sua área corpórea.

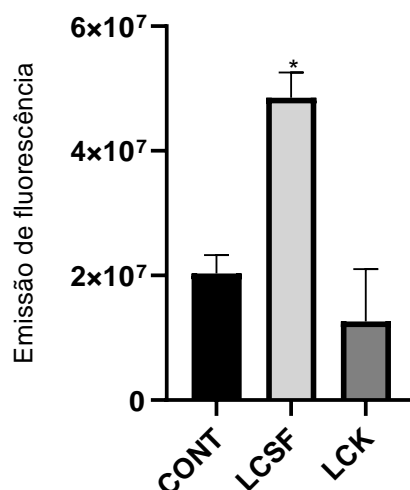


**Figura 2. a.** Avaliação da toxicidade aguda em bebida fermentada à base de coco (LCK) em comparação com o leite de coco fermentado (LCK) sobre a taxa de desenvolvimento corporal. **b.** Avaliação da toxicidade aguda em bebida fermentada à base de coco (LCK) em comparação com o leite de coco sem fermentar (LCSF) sobre a taxa de sobrevivência. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM \* $p < 0,001$  em comparação com o grupo Controle (CONT) e # $p < 0,001$  em comparação com o grupo controle positivo (LEV).

Portanto, os resultados demonstram que, quando comparados, houve diferença entre o grupo tratado com o LCSF e o grupo tratado com LCK. O estudo apresentou pela primeira vez uma análise de toxicidade em *C. elegans* sobre bebidas probióticas à base de coco.

### 5.2.2. Medição de ERO intracelular em *C. Elegans*

O nematoide *C. elegans* foi utilizado para avaliar o potencial antioxidante da bebida fermentada com kefir (LCK) comparado ao leite de coco sem fermentação (LCSF) (Figura 3). O efeito da bebida foi demonstrado por meio do ensaio que avaliou a produção basal de EROs ao longo dos períodos de 0h, 2h, 4h e 6h.

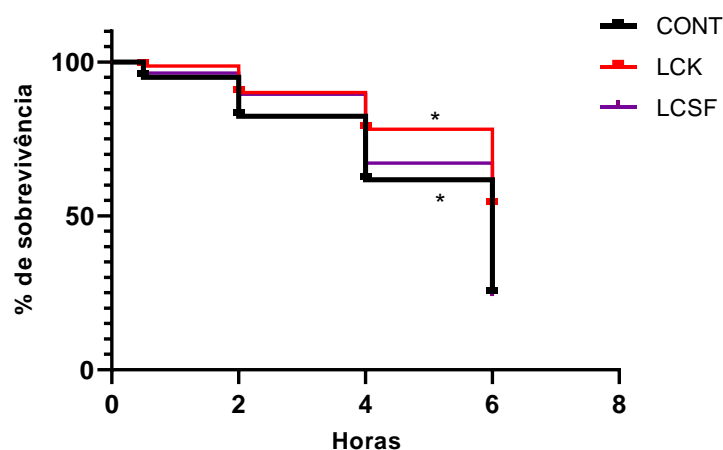


**Figura 3:** Média de emissão de fluorescência entre os tratamentos. \* $p < 0,001$ , comparado ao grupo controle (CONT) (solução tampão M9). Foram testados os grupos leite de coco sem fermentar (LCSF) e leite de coco fermentado com kefir (LCK). Os resultados são expressos como porcentagem de fluorescência em relação aos controles nos tempos 0h, 2h, 4h e 6h. Os resultados são apresentados como valores médios  $\pm$  DP. A significância estatística foi calculada usando a análise de variância ANOVA para comparação de médias, teste post-hoc de TuKey.

O tratamento apenas com leite de coco (LCSF) não impediu o desenvolvimento das EROs, apresentando, portanto, diferença significativa com o grupo controle ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, o grupo de nematoides que recebeu o produto fermentado com kefir (LCK), emitiu menos fluorescência, comprovando menor produção de EROs ao longo das horas do ensaio. Não havendo para esse grupo, portanto, diferença significativa quando comparado ao controle ( $p > 0,001$ ).

### 5.2.3. Estresse Químico

Para avaliar a resistência ao estresse químico os animais foram tratados com solução tampão (M9) (CONT), com o leite de coco sem estar fermentado com o kefir (LCSF) e com o leite de coco fermentado pelo kefir (LCK). Após 48 horas os três grupos foram expostos ao peróxido de hidrogênio tert-butil 7,5 mM (t-BOOH). Os resultados estão apresentados na figura 5.

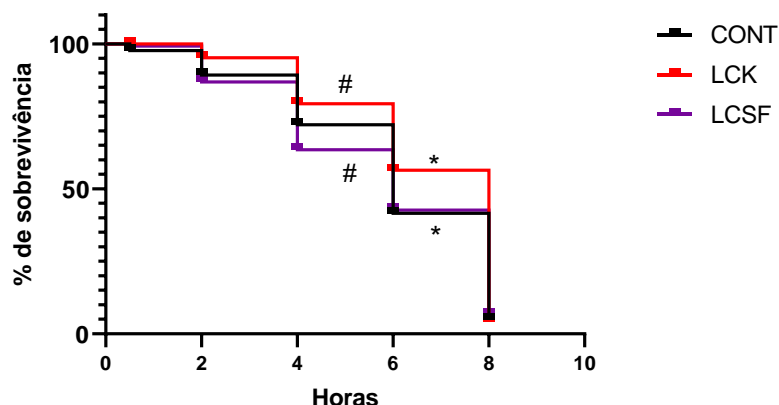


**Figura 5:** Percentual de sobrevivência entre os grupos CONT (tampão M9 + t-BOOH), LCK (leite de coco fermentado com kefir + t-BOOH) e LCSF (leite de coco sem fermentar + t-BOOH) ao longo dos períodos de 0h, 2h, 4h, 6h e 8h. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. Os valores foram considerados significantes para  $p < 0,05$ .

O grupo tratado com o leite de coco fermentado pelo kefir (LCK) apresentou diferença estatística ao ser comparado com o grupo controle (CONT) a partir das 4 horas de análise ( $p < 0,05$ ). Logo, o LCK promoveu maior percentual de sobrevivência entre os vermes ao longo das horas, quando comparado ao grupo de vermes (CONT) que não recebeu a bebida. Por outro lado, o LCSF não alterou significativamente a taxa de sobrevivência quando comparado ao grupo CONT ( $p > 0,05$ ).

#### **5.2.4. Estresse Térmico**

Os efeitos das bebidas à base de leite de coco, fermentadas (LCK) ou não (LCSF), na termotolerância, foram analisados em animais no estágio larval L4, expostos à 35 °C, por 8 horas. A figura 6 demonstra que o tratamento com o leite de coco fermentado com kefir (LCK) contribuiu para o aumento da taxa de sobrevivência do modelo *C. Elegans*. O grupo LCK apresentou sobrevivência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) após 4 horas de análise, comparado ao grupo que recebeu apenas o leite de coco (LCSF). Da mesma forma, a partir das 6 horas de análise, o animais do grupo LCK exibiram termotolerância maior em comparação ao grupo controle (CONT) ( $p < 0,05$ ), indicando que a fermentação com kefir pode aumentar a sobrevivência sob estresse térmico (Figura 6).



**Figura 6:** Percentual de sobrevivência entre os grupos CONT (tampão M9), LCK (leite de coco fermentado com kefir) e LCSF (leite de coco sem fermentar) ao longo dos períodos de 0h, 2h, 4h, 6h e 8h. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. Os valores foram considerados significantes para  $p < 0,05$ . \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo LCSF.

## 6. Discussão

O presente trabalho demonstrou, pela primeira vez no modelo *C. Elegans*, que a bebida elaborada a partir de dados da literatura, levando em consideração a atividade antioxidante e o pH, foi capaz de prever condições apropriadas para obtenção do produto com perfil antioxidante, capaz de aumentar a sobrevivência após estresse térmico e químico. Dessa forma, a bebida elaborada com 10% de leite de coco (100 g de polpa, 900 ml de água de coco), fermentada com 2% de grãos de kefir, à temperatura de 30°C, aparece como possível opção de alimento não lácteo, capaz de atender a crescente demanda por esse tipo de alimento funcional, direcionado a consumidores vegetarianos, veganos, intolerantes à lactose ou alérgicos às proteínas do leite.

Os estresses químico e térmico afetam negativamente a saúde e a integridade metabólica de humanos e animais por meio do desencadeamento do EO e da



inflamação. No modelo animal utilizado – *C. Elegans* –, o tempo de vida é proporcional à sua resistência ao estresse ambiental. Sob estresse, as células desenvolvem resposta inflamatória e induzem a expressão gênica para prevenir a degeneração celular (Link, 2006).

No presente estudo, a bebida fermentada pelo kefir à base de leite de coco, preveniu o desenvolvimento das EROs, comprovado pela análise de fluorescência de emissão de EROs. Além disso, os ensaios de estresse, utilizando o modelo *C. Elegans*, demonstraram que a bebida elaborada promove termotolerância, quando os nematoides são submetidos ao estresse térmico, e proporciona aumento significativo na taxa de sobrevivência, quando submetidos ao estresse químico.

Ajeigbe e colaboradores (2022) analisaram as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da água e do leite de coco sobre o estresse térmico em ratos submetidos ao calor de 40°C, duas horas ao dia, por 14 dias. Os pesquisadores avaliaram a integridade gastrointestinal - motilidade gastrointestinal, EO e inflamação -, por meio do cortisol sérico, peroxidação lipídica, atividades de enzimas antioxidantes e citocinas inflamatórias. Os resultados mostraram que os animais tratados com a água e com o leite de coco apresentaram, significativamente, menos alterações na motilidade intestinal, supressão da resposta inflamatória e aumento de citocinas anti-inflamatórias - redução do fator de necrose TNF- $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e aumento da IL-4 e IL-10 -.

Os autores demonstraram, portanto, que a água de coco e o leite de coco podem melhorar a dismotilidade intestinal, associada ao estresse térmico, por meio da redução do EO e da supressão das respostas inflamatórias. Os resultados foram

atribuídos aos compostos funcionais presentes nas bebidas, especialmente polifenóis, que têm a capacidade de capturar e neutralizar espécies oxidantes, por meio da doação de um próton ao radical livre para neutralizá-lo, formando estruturas de ressonância e equilibradas eletronicamente.

Ayuda-Durán *et al.* (2022) demonstrou como diferentes compostos bioativos, especialmente os polifenóis, podem modular a composição e a função da MI. Os autores verificaram os efeitos na resistência ao EO, induzido pelo estresse térmico, no modelo *C. Elegans*, quando cultivado na presença de flavonoides e diferentes cepas probióticas. Os pesquisadores observaram que, o tratamento dos nematoides com componentes da dieta e cepas probióticas, mas que não continham flavonoides, não alterou o tamanho e fertilidade dos vermes, assim como a resistência ao estresse oxidativo. Por outro lado, o grupo que recebeu uma associação entre flavonoides e cepas probióticas, apresentou melhor desenvolvimento e maior resistência ao EO.

Kumar e colaboradores (2022) investigaram os efeitos do tratamento com cepas probióticas específicas e polifenóis no modelo *C. Elegans*, submetidos ao estresse térmico. Os pesquisadores sugeriram que os flavonoides podem neutralizar os danos oxidativos desenvolvidos pelo estresse. Porém, segundo os autores, esses efeitos são pronunciados quando o tratamento é associado a cepas probióticas. De fato, outros trabalhos que estudaram o possível efeito benéfico dos MO probióticos, em combinação com polifenóis, atribuem os benefícios observados à capacidade dos MOs em metabolizar os compostos fenólicos (Barroso *et al.*, 2013; Barroso *et al.*, 2014; González *et al.*, 2016). Kumar (2022) discutiu seus resultados reforçando que os flavonoides são absorvidos

por *C. Elegans* e que a combinação entre cepas probióticas e polifenóis é determinante para o efeito antioxidante.

O efeito da fermentação sobre a elevação dos teores de compostos fenólicos e do aumento da atividade antioxidante de suco vegetal pode ocorrer por meio de reações de biotransformação (Ye *et al.*, 2019). Tais reações são induzidas por enzimas endógenas produzidas pelos MOs probióticos e levam a biossíntese de compostos bioativos (Verni *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2019). Evidências mostram que as reações enzimáticas microbianas e mudanças bioquímicas do meio (ex.: redução do pH) promovem transformações metabólicas de compostos fenólicos que levam a biossíntese de compostos com propriedades antioxidantes mais elevadas que os seus precursores (Verni *et al.*, 2019).

Somado a isso, os dados da análise do EO *in vivo* reforçam os benefícios da bebida à base de leite de coco fermentada com kefir. Provavelmente os flavonoides presentes protegeram contra o estresse diretamente, por meio do sequestro dos radicais livres, ou indiretamente, por meio da indução da ação das enzimas antioxidantes, aumentando, dessa forma, a resistência ao estresse. Bonomo *et al.* (2014), ao avaliar os benefícios do açai (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre o EO, no modelo *C. Elegans*, também identificaram a presença de flavonoides e associaram a atividade desses compostos na modulação e resistência ao estresse.

A atividade antioxidante, utilizada como parâmetro para selecionar a bebida fermentada com melhor perfil, foi avaliada por meio do ensaio de ABTS, que consiste em um experimento *in vitro* amplamente utilizado para avaliar a

propriedade antioxidante de produtos naturais (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Moon & Shibamoto, 2009).

Sabokbar *et al* (2016) verificaram que a fermentação da bebida à base de açúcar de coco e grãos de kefir resultou em melhora das propriedades funcionais do leite fermentado, levando ao aumento da atividade antioxidante. Ao comparar o efeito antioxidante em tipos específicos de açúcares não convencionais, a bebida fermentada em açúcar de coco apresentou resultados pronunciados. A concentração e os tipos de MOs desenvolvidos nos produtos com o açúcar de coco podem ter aumentado a atividade metabólica dessas culturas, resultando em maior formação de compostos bioativos, como pequenos peptídeos ou compostos fenólicos.

Loki & Rajamohan (2003) avaliaram os efeitos hepatoprotetores e antioxidantes da água de coco em ratos intoxicados com tetracloreto de carbono. A lesão hepática foi evidenciada pelo aumento de marcadores inflamatórios, peroxidação lipídica e pela redução da atividade de enzimas antioxidantes. Os animais intoxicados com o tetracloreto e tratados com a água de coco, apresentaram os valores estabelecidos após o tratamento, com redução do EO e aumento dos antioxidantes endógenos. De acordo com os pesquisadores, os resultados se devem às quantidades expressivas de L-arginina, que controla a formação de radicais livres e favorece a produção dos antioxidantes. Além disso, a vitamina C presente na bebida, segundo os autores, reduziu a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a formação das ERONs.

Nevin & Rajamohan, em 2005, realizaram um estudo para comparar o efeito do óleo de coco com o óleo de amendoim e óleo de copra , sobre a peroxidação

lipídica e nos níveis de enzimas antioxidantes em ratos, após 45 dias de tratamento. Os resultados mostraram que a administração de óleo de coco aumentou a proporção de enzimas antioxidantes e reduziu a peroxidação lipídica, quando comparado aos grupos que receberam o óleo de amendoim e copra. Os pesquisadores relataram que a presença de polifenóis, flavanonas e diidroflavonóis, presentes no óleo de coco, previne a peroxidação. Além disso, os efeitos benéficos do óleo de coco também foram associados às diferenças na absorção, transporte e catabolismo dos ácidos graxos presentes.

O potencial antioxidante dos compostos naturais presentes no coco também foi verificado por Das *et al.* (2021). Foram investigados os efeitos do extrato de suco de mesocarpo de coco verde em complicações relacionadas ao DM2, induzido por estreptozotocina, em animais, assim como as funções antioxidantes dos compostos naturais presentes no suco. Os resultados mostraram que compostos identificados no suco do coco apresentaram um potencial antioxidante promissor. Houve diminuição da glicemia, assim como das transaminases, redução da creatinina, do ácido úrico e dos níveis lipídicos. Por outro lado, os pesquisadores confirmaram o aumento da tolerância e da homeostase da glicose. Os pesos corporais dos animais e de seus órgãos foram parcialmente restaurados. Os autores justificaram os resultados à presença de fenólicos, flavonoides e carotenóides no suco de coco.

A análise da toxicidade demonstrou, pela primeira vez, que o produto avaliado não apresenta efeitos prejudiciais no modelo experimental *in vivo* (*C. Elegans*). A investigação demonstrou que o tratamento agudo com bebida probiótica de coco não alterou a taxa de sobrevivência dos vermes. Em conformidade a esse resultado, a medição da área corporal foi aumentada entre os grupos tratados.

Park *et al.* (2018) descreveram em seu estudo a interação entre cepas de *Lactobacillus*, no qual apresentavam potencial de ligação às células intestinais e promoviam a longevidade e melhora na imunidade dos hospedeiros, o *C. elegans*. Em outro estudo, Kumar *et al.* (2019) relataram que, ao fornecer uma alimentação probiótica aos *C. Elegans*, foi constatado uma redução da carga bacteriana alimentar quando comparada à comumente oferecida, *E. coli* OP50, que poderia causar um prolongamento de sua vida. Sendo as duas vertentes passíveis de ocorrência nesse estudo.

A sobrevivência dos vermes leva a hipóteses de possíveis fatores que, ao interagir com os probióticos, mantém a longevidade do animal. Dito isso, alguns autores propõem a relação ao uso de probióticos e a ativação da via de sinalização da MAPK em *C. elegans*, protegendo os vermes contra o estresse por meio dessa via. A MAPK desempenha um importante papel na regulação da longevidade e na defesa relacionada a imunidade inata (Kumar *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021).

Os efeitos de sobrevivência e desenvolvimento podem estar correlacionados aos melhoramentos observados pela ação dos probióticos sobre o organismo, como a imunomodulação, a suplementação nutricional e ainda, a ligação às células do hospedeiro, em específico às células intestinais, no qual o modelo experimental *C. elegans* mimetiza a fisiologia humana de absorção nas microvilosidades (Kumar *et al.*, 2019; Kunyeit *et al.*, 2015).

Outra hipótese levantada para compreender o desenvolvimento dos vermes pode ser dada pela composição da bebida utilizada no tratamento. O coco apresenta quantidades pronunciadas de lipídeos, especialmente o ácido láurico,

que é caracterizado por ser um ácido graxo saturado com funções antiinflamatórias (Ekanayaka *et al.*, 2013). Os nematoides são aproximadamente 70% ortológicos - relação entre genes de um ancestral comum, compartilhados por duas espécies (Bruce *et al.* 2004) - em relação a genes lipídicos humanos, e entre esses genes, expressam 20% de genes para doenças metabólicas humanas (Hunt, 2016). Portanto, conseguinte às hipóteses e resultados apresentados, pode-se dizer que o efeito atóxico do produto fermentado derivado do coco em *C. elegans* é promissor, uma vez que vias de sinalização e mecanismos de ação de toxicidade em humanos é mantida em vermes (Hunt, 2016).

Outro resultado obtido com relação à bebida selecionada foi o crescimento dos MO. De fato, o kefir e o leite de coco são um substrato adequado para o desenvolvimento dos grãos. Estudos demonstram resultados semelhantes (Ghasemlou, Khodaiyan & Gharibzahedi, 2012; Sethi, Tyagi, Anurag, 2016; Mauro & Garcia, 2019), onde a associação de bebidas de origem vegetal e cepas probióticas presentes no kefir, oferecem elementos nutricionais que estimulam o crescimento dos MO presentes na bebida. O produto fermentado com os grãos de kefir apresentou expressivo aumento na contagem de MO - bactérias e leveduras - e as quantidades encontradas estão de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para alimentos com finalidades probióticas, que sugere um mínimo de 10<sup>7</sup> UFC/g e de 10<sup>4</sup> UFC/g para bactérias e de leveduras, respectivamente, para os alimentos contendo grãos de kefir (WHO, 2003). Esses dados mostram que a bebida selecionada, preparada à base de leite de coco e fermentada com kefir, foi capaz de viabilizar o crescimento e a sobrevivência de probióticos.

Os achados do presente estudo são reforçados por Mauro & Garcia (2019), que observaram que cepas específicas foram capazes de se multiplicar no leite de coco, sem a necessidade de suplementação de açúcar, utilizando os carboidratos naturalmente presentes no leite de coco como fonte energética. Os pesquisadores inferiram que o metabolismo das bactérias sofre interferência da matriz fermentativa, dependendo da quantidade de açúcares fermentáveis e nutrientes disponíveis.

Portanto, similarmente aos resultados do presente trabalho, constata-se que o leite de coco apresenta nutrientes suficientes e viáveis para o crescimento de probióticos, funcionando como prebiótico, promovendo uma relação de simbiose (Dahal *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2019; Mauro & Garcia, 2019).

Conforme esperado, em relação à análise de pH, a investigação proposta demonstrou que houve variação do pH para um meio mais ácido (4,5), característico da fermentação ácido-lática realizada por bactérias fermentadoras (Ferreira *et al.*, 2019).

Os valores de pH e acidez obtidos estão de acordo com valores encontrados para leite de coco fermentado por *Lactobacillus reuteri*, descrito por Mauro & Garcia (2019). A fermentação consiste na degradação de moléculas por bactéria e leveduras gerando ácido lático e ácido acético. Mauro & Garcia (2019) observaram que a presença de ácido málico na composição de bebidas à base de coco fermentadas, fora esgotada, gerando a hipótese de fermentação por bactérias lácticas pela via malolática. Outro achado descrito tem relação a depleção total do ácido cítrico contido no coco, podendo estar relacionado com



a metabolização de citrato pelos *Lactobacillus*, transformando em CO<sub>2</sub> e ácido acético.

Em consonância, Laureys *et al.* (2016) investigaram o crescimento de bactérias presentes no kefir de água, como as bifidobactérias, em condições adversas. O crescimento das estirpes foi avaliado sob condições atmosféricas variadas, em diferentes valores de pH e temperatura. Os autores constaram que o crescimento pode ocorrer em condições anaeróbias, microaeróbicas e aeróbicas, com pH entre 4,0 e 8,0, e entre 4 e 37°C, com temperatura ótima de 28°C. Observaram ainda que o crescimento não ocorre em pH inferior a 3,5 ou acima de 9,0, e em temperaturas superiores a 45°C.

M'Hir *et al.* (2019), ao avaliar as melhores características para a produção de uma bebida à base de tâmara, e fermentada por grãos de kefir, também constataram que o valor ótimo do pH para fermentação variou de 4,6 a 4,02, após 48 h de fermentação. Esses valores reduzidos são resultado da produção de ácidos orgânicos por bactérias ácido lácticas e leveduras (Garrote, Abraham & De Antoni, 2010; Ozcan *et al.*, 2018).

Valores semelhantes de pH foram observados também em estudos anteriores (Al-Shahib & Marshall, 2003; Pereira *et al.*, 2015). Pereira e colaboradores (2015) relataram que o pH das bebidas de kefir de soro de leite variou entre 4,2 e 4,5 por conta do efeito tampão das proteínas de soro de leite. Deve ser reforçado que o pH ácido é importante para preservar os alimentos dos MO que os deterioram (Perez Diaz, 2014).

A temperatura de fermentação foi escolhida de acordo com os resultados de pH. Dessa forma, a temperatura de 30°C influenciou a redução do pH (~4). Os ácidos

orgânicos, juntamente com os demais metabólitos provenientes do processo de fermentação das bactérias ácido lácticas, propiciam a melhora do perfil funcional e nutricional de alimentos (Svensson *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2019). Nesse sentido, destaca-se a conversão metabólica que ocorre com compostos fenólicos, resultando na formação de metabólitos potencialmente mais ativos (Pontonio *et al.*, 2019; Ricci *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2019). Ademais, a redução do pH em bebidas fermentadas possui a capacidade de limitar o crescimento de MO não desejáveis, propiciando melhor conservação e durabilidade à bebida (Łopusiewicz *et al.*, 2019).

Com relação à concentração de kefir, a concentração que apresenta melhor índice de atividade antioxidante, de acordo com a análise ABTS, é encontrado na faixa que corresponde ao teor de 2% (de Almeida Silva *et al.*, 2020; Friques *et al.*, 2015; Hatmal *et al.*, 2018; Koh *et al.*, 2018; Otles & Cagindi, 2003). Dessa forma, a bebida elaborada no presente estudo foi preparada utilizando a concentração de grãos 2%.

Outros estudos sugerem proporções semelhantes, onde as concentrações variaram entre 2 e 10% (Hatmal *et al.*, 2018; Otles & Cagindi, 2003). M'hir e colaboradores (2019) buscaram otimizar a formulação de uma bebida de soro de leite funcional e fermentada por grãos de kefir. Os autores utilizaram a metodologia de superfície de resposta para determinar a proporção ideal de soro de leite, xarope de tâmara e grãos de kefir, associando ao melhor pH, maior viabilidade de bactérias lácticas, leveduras e atividade antioxidante. Além de outros resultados, os pesquisadores concluíram que a concentração de 2,08% de grãos de kefir corresponde ao valor ideal para a formulação de uma bebida fermentada, nutritiva e de baixo custo. A bebida apresentou propriedades

organolépticas aceitáveis, as quais foram testadas por meio da análise sensorial geral, utilizando teste de aceitação.

A análise centesimal da bebida mostrou que o teor de carboidratos do produto fermentado apresentou redução quando comparada à bebida não fermentada. Essa redução ocorreu, possivelmente, pelo consumo dos açúcares pelas bactérias e leveduras como fonte energética (Mantzourani *et al.*, 2020; Wang & Gibson, 1993). O carboidrato predominante no leite de coco é a sacarose (Mantzourani *et al.*, 2020). As concentrações de açúcares estão de acordo com o valor encontrado nas polpas de coco maduro (Mantzourani *et al.*, 2020) e o valor encontrado no leite de coco é proporcional à diluição utilizada e processamento. Portanto, houve hidrólise e consumo de sacarose pelas cepas durante o processo de fermentação.

Apesar de não apresentar alteração na avaliação centesimal entre as bebidas não fermentadas e fermentadas em relação à quantidade de gorduras, é importante ressaltar que o teor de lipídeos presente no leite de coco é relativamente alto quando comparado ao leite de vaca, cabra ou ovelha, podendo ser utilizado para extração do óleo de coco (Belewu & Belewu, 2007). O coco tem em sua composição cerca de 65% de ácidos graxos saturados de cadeia média que corroboram para o fornecimento de um maior valor energético (Belewu & Belewu, 2007; Deb Mandal & Mandal, 2011). Há um indicativo que esses ácidos graxos de cadeia média têm capacidade redutora de colesterol sérico (Karunasiri *et al.*, 2020), com consequentes benefícios relacionados ao quadro inflamatório desencadeado pelo EO (Karunasiri *et al.*, 2020).

A fermentação de bebidas produzidas com matriz vegetal tem sido uma estratégia utilizada para preservar as características nutricionais do alimento e aprimorar a biodisponibilidade de componentes bioativos (Sadeq Hasan Al-Sheraji *et al.*, 2013). Neste estudo, o processo de fermentação aumentou a umidade da bebida e preservou os níveis de lipídios, proteínas e cinzas, indicando que o processo de fermentação contribuiu para obtenção de um produto com a composição nutricional preservada, podendo, dessa forma, garantir a viabilidade dos probióticos e contribuir para que os benefícios funcionais do alimento sejam alcançados (Valero-Cases *et al.*, 2020).

## **7. Conclusão**

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez no modelo *C. Elegans*, que a bebida elaborada com 10% de endosperma e 90% de água de coco, fermentada com 2% de grãos de kefir de água, à temperatura de 30°C, aparece como possível opção de alimento simbiótico não lácteo, com potencial simbiótico, antioxidante e expressivo valor nutricional, se mostrando estável, sem interferência da temperatura e do pH.

Os ensaios experimentais mostraram que o produto desenvolvido não demonstrou toxicidade *in vivo* e apresentou resultados positivos para atividade antioxidante, características físico-químicas e composição centesimal adequadas, bem como presença de MO probióticos.

A bebida foi capaz de promover redução do estresse térmico e químico, comprovado pelo aumento da taxa de sobrevivência dos nematoides, não interferindo na mortalidade e no desenvolvimento dos animais, podendo aumentar a sobrevivência destes organismos.

Portanto, diante de um cenário em que a população está cada vez mais exposta ao EO e suas doenças associadas, alternativas de alimentos funcionais, com potencial modulador e antioxidante, se mostram necessárias para o controle e prevenção desse quadro.

## 8. Referências

- Adams L., Franco M.C., Estevez A.G. (2015). Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med.* 240(6):711-7. <https://doi.org/10.1177/1535370215581314>.
- Agulló V., Moreno D.A., Domínguez-Perles R., García-Viguera C. (2022). Contribution of the diverse experimental models to unravelling the biological scope of dietary (poly)phenols. *J Sci Food Agric.* 102(10):3940-3951. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11865>.
- Ajeigbe K.O., Oladokun O.O., Owonikoko M.W., Adegoke G.A. (2022). Effect of coconut water and milk on heat stress-induced gastrointestinal tract dysmotility in rats: Role of oxidative stress and inflammatory response. *J Food Biochem.* 46(7):e14129. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14129>.
- Al-Shahib W., Marshall R.J. (2003). The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? *Int J Food Sci Nutr.* 54(4):247-59. <https://doi.org/10.1080/09637480120091982>.
- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593-615. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>.
- Alwan A. (2010). Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *Lancet.* 376(9755):1861-1868. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61853-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61853-3).

- Antoine J.M. (2010). Probiotics: beneficial factors of the defence system. *Proc Nutr Soc.* 69(3):429-33. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001692>.
- Ardiansyah, Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Koseki, T., & Komai, M. (2008). Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2825–2830. <https://doi.org/10.1021/jf072896y>.
- Augusti, P. R., Brasil, A. V. S., Souto, C., Göethel, G., de Oliveira Rios, A., Emanuelli, T., Bürger, M. E., & Garcia, S. C. (2017). Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.045>.
- Ayuda-Durán B., Sánchez-Hernández E., González-Manzano S., Santos-Buelga C., González-Paramás A.M. (2022). The effects of polyphenols against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* are determined by coexisting bacteria. *Front Nutr.* 1; 9:989427. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.989427>.
- Barbosa K.B., Costa N.M., Alfenas R.C., Sérgio Oliveira De Paula S.O., Minim V.P., Bressan J. (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev Nutr.* 2010;23. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
- Belewu, A. & Belewu, Y. (2007). Comparative Physico-Chemical Evaluation of Tiger-nut, Soybean and Coconut Milk Sources. *National Agricultural Research Centre.* 9-5, 785-787.

- Bhatti J.S., Bhatti G.K., Reddy P.H. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* 1863:1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5(1):9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- Bouchez C., Devin A. (2019). Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells.* 8:287. <https://doi.org/10.3390/cells8040287>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes e Recomendações para o Cuidado Integral de Doenças crônicas Não-Transmissíveis: promoção da saúde, vigilância, prevenção e assistência. Brasília, 2008.
- Brenner S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77, 71-94.
- Briand, F., Naik, U., Fuki, I., Millar, S., Macphee, C., Walker, M., Billheimer, J., Rothblat, G., Rader, J. (2009). Both the peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  agonist, GW0742, and ezetimibe promote reverse cholesterol transport in mice by reducing intestinal reabsorption of HDL-derived cholesterol. *Clinical & Translational Science.* 2(2), 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2009.00098.x>.
- Bouhafs L., Moudilou E.N., Exbrayat J.M., Lahouel M., Idoui T. (2015). Protective effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* BJ0021 on liver and kidney



oxidative stress and apoptosis induced by endosulfan in pregnant rats. *Ren* 37(8):1370-8. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1073543>.

Buschwald H. (2005). Consensus statement: Bariatric surgery for morbidobesity: Health implications for patients, health professionals and third-party payers. *Surg Obes Relat Dis.* 1:371-81. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2005.04.002>.

Cao, K., Zhang, K., Ma, .M, Ma, J., Tian, J., Jin, Y. (2021). Lactobacillus mediates the expression of NPC1L1, CYP7A1, and ABCG5 genes to regulate cholesterol. *Food Sci Nutr.* 30; 9 (12). 6882-6891. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2600>.

Charão, M. F., Souto, C., Brucker, N., Barth, A., Jornada, D. S., Fagundez, D., Ávila, D. S., Eifler-Lima, V. L., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., & Garcia, S. C. (2015). *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5093–5106. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84909>.

Chandrasekaran A., Idelchik M.D.P.S., Melendez J.A. (2017). Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol.* 11:91–102. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.005>.

Chen Z., Shi J., Yang X., Nan B., Liu Y., Wang Z. (2015). Chemical and Physical Characteristics and Antioxidant Activities of the Exopolysaccharide Produced by Tibetan Kefir Grains during Milk Fermentation. *Int. Dairy J.* 43:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.004>.

Corsi A.K., Wightman B., Chalfie M. (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. WormBook, ed. The C. elegans Research Community, *WormBook*.

Cuadrado A., Martín-Moldes Z., Ye J., Lastres-Becker I. (2014). Transcription factors NRF2 and NF- $\kappa$ B are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation. *J Biol Chem.* 289(22):15244-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540633>.

Cunarro J., Casado S., Lugalde J., Tovar S. (2018). Hypothalamic Mitochondrial Dysfunction as a Target in Obesity and Metabolic Disease. *Front. Endocrinol.* 9:283. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00283>.

Dahal, S., Ojha, P., & Karki, B. (2020). Functional quality evaluation and shelf life study of synbiotic yacon juice. *Food Science and Nutrition*, 8(3), 1546–1553. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1440>.

Das R.R., Rahman M.A., Al-Araby S.Q., Islam M.S., Rashid M..M, Babteen N.A., Alnajeebi A.M., Alharbi H.F.H., Jeandet P., Rafi M.K.J., Siddique T.A., Uddin M.N., Zakaria Z.A. (2021). The Antioxidative Role of Natural Compounds from a Green Coconut Mesocarp Undeniably Contributes to Control Diabetic Complications as Evidenced by the Associated Genes and Biochemical Indexes. *Oxid Med Cell Longev.* 2021:9711176. <https://doi.org/10.1155/2021/9711176>.

de Almeida Silva, M., Mowry, F. E., Peaden, S. C., Andrade, T. U., & Biancardi, V. C. (2020). Kefir ameliorates hypertension via gut–brain mechanisms in

spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 77, 108318. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108318>.

De Oliveira, L., De Almeida, O., De Almeida Rezende, S., Dantas, H., De Lima Silva, S., De Lourdes Assunção Araújo De Azevedo, F., Alves, R., De Menezes, S., Dos Santos, F., Gonçalves, F., Schini-Kerth, B., & De Medeiros, A. (2020). Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases. *In Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2020/1954398>.

Deb Mandal, M., Mandal, S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4-3, 241-247. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60078-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60078-3).

Dengg M., van Meel J.C. (2004). *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 50(3):209-14. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.04.002>.

Dubois-deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., & Pinet, F. (2020). Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Antioxidants*, 9(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>.

Ekanayaka, A., Ekanayaka, K., Perera, B., De Silva, M. (2013). Impact of traditional dietary supplement with coconut milk and soya milk on the lipid profile in normal free living subjects. *Journal of Nutrition and Metabolism*. <https://doi.org/10.1155/2013/481068>.

- Eyres, L., Eyres, F., Chisholm, A., Brown, C. (2016). Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutr Rev.* 74(4). 267-80. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw002>.
- Falcinelli S., Rodiles A., Unniappan S., Picchiatti S., Gioacchini G., Merrifield D.L., Carnevali O. (2016). Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. *Sci Rep.* 6:18061. <https://doi.org/10.1038/srep18061>.
- Fahmy H.A., Ismail A.F.M. (2015). Gastroprotective Effect of Kefir on Ulcer Induced in Irradiated Rats. *J. Photochem. Photobiol. B.* 144:85–93. <https://10.1016/j.jphotobiol.2015.02.009>.
- Farag M.A., Jomaa S.A., El-Wahed A.A., El-Seedi A. H. R. (2020). The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients.* 12(2):346. <https://doi.org/10.3390/nu12020346>.
- Feng, S., Cheng, H., Xu, Z., Shen, S., Yuan, M., Liu, J., Ding, C. (2015). Thermal stress resistance and aging effects of Panax notoginseng polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81: 88-194. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.057>.
- Ferreira, S., Cappato, P., Silva, R., Rocha S., Guimarães, T., Balthazar, F., Neto, P. (2019). Ohmic heating for processing of whey-raspberry flavored beverage. *Beverage Food Chemistry*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125018>.

- Fiorda, A., de Melo Pereira, V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, K., Soccol, R. (2016). Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. *Food Sci Technol Int.* 22(8). 732-742. <https://doi.org/10.1177/1082013216646491>.
- Fortuño A., Bidegain J., Baltanás A., Moreno M.U., Montero L., Landecho M.F., Beloqui O., Díez J., Zalba G. (2010). Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. *J. Hypertens.* 28:1944 –1950. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833c21af>.
- Friques, A. G. F., Arpini, C. M., Kalil, I. C., Gava, A. L., Leal, M. A., Porto, M. L., Nogueira, B. V., Dias, A. T., Andrade, T. U., Pereira, T. M. C., Meyrelles, S. S., Campagnaro, B. P., & Vasquez, E. C. (2015). Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 390. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0759-7>.
- Garrote, L., Abraham, G., De Antoni, L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications.* 327–340. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch18>.
- Genestra M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 19(9):1807–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>.
- Ghasemlou, Khodaiyan, & Gharibzahedi. (2012). Enhanced production of Iranian kefir grain biomass by optimization and empirical modeling of fermentation

- conditions using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*. 5-8, 3230–3235. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0575-x>
- Gilliland, E., Nelson, R., Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 49(2). 377-81. <https://doi.org/10.1128/aem.49.2.377-381.1985>.
- Gonzales, O., & Tanchuco, R. (1977). Chemical composition and functional properties of coconut protein isolate (CPI). *Philippine Journal of Coconut Studies*. 11, 21– 30.
- Gunetileke, K., & Laurentius, S. (1974). Conditions for the separation of oil and protein from coconut milk emulsion. *Journal of Food Science*. 39(2), 230– 3.
- Graham E.J., Adler F.R. (2013). Long-term models of oxidative stress and mitochondrial damage in insulin resistance progression. *J Theor Biol*. 340:238-50. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.09.028>.
- Griendling K.K., Camargo L.L., Rios F.J., Alves-Lopes R., Montezano A.C., Touyz R.M. (2021). Oxidative Stress and Hypertension. *Circ Res*. 128(7):993-1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318063>.
- Guidoni, M., De Christo Scherer, M. M., Figueira, M. M., Schmitt, E. F. P., De Almeida, L. C., Scherer, R., Bogusz, S., & Fronza, M. (2019). Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52(2), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20188209>.

- Guimaraes, D. A., Batista, R. I. M., & Tanus-Santos, J. E. (2020). Nitrate and nitrite-based therapy to attenuate cardiovascular remodelling in arterial hypertension. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, bcpt.13474. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13474>.
- Gurzov E.N., Tran M., Fernandez-Rojo M.A., Merry T.L., Zhang X., Xu Y., Fukushima A., Waters M.J., Watt M.J., Andrikopoulos S., Neel B.G., Tiganis T. (2014). Hepatic oxidative stress promotes insulin-STAT-5 signaling and obesity by inactivating protein tyrosine phosphatase N2. *Cell Metab.* 20(1):85-102. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.011>.
- Güven A., Güven A., Gülmez M. (2003). The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 50:412–416. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00693.x>.
- Halliwell B. (2022). On 'Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts' by Barry Halliwell and John M.C.Gutteridge. *Arch Biochem Biophys.* 726:109320. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109320>.
- Halliwell B, Gutteridge. (2007). Free radicals in biology and medicine. *Oxford*.
- Hamet, F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, L. (2013). Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirano faciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiol.* 36 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.022>.

- Hatmal, M. M., Nuirat, A., Zihlif, M. A., & Taha, M. O. (2018). Exploring the influence of culture conditions on kefir's anticancer properties. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3771–3777. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13539>.
- Hernández-Aguilera A., Rull A., Rodríguez-Gallego E., Riera-Borrull M., Luciano-Mateo F., Camps J., Menéndez J.A., Joven J. (2013). Mitochondrial dysfunction: A basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediat. Inflamm.* 2013:135698. <https://doi.org/10.1155/2013/135698>.
- Hu, R., Zeng, F., Wu, L., Wan, X., Chen, Y., Zhang, J., & Liu, B. (2019). Fermented carrot juice attenuates type 2 diabetes by mediating gut microbiota in rats. *Food and Function*, 10(5), 2935–2946. <https://doi.org/10.1039/c9fo00475k>.
- Hunt, P. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*. 37-1, 50–59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>.
- Jama H.A., Kaye D.M., Marques F.Z. (2019) The gut microbiota and blood pressure in experimental models. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 28(2):97-104. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000476>
- Jeske, S., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Evaluation of physicochemical and glycaemic properties of commercial plant-based milk substitutes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1), 26-33. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-016-0583-0>.
- Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel



electrophoresis. *Food Microbiol.* 770–775.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.009>.

Jones C.W., Clark J.H. editors. (1999). Applications of hydrogen peroxide and derivatives. *Cambridge: Royal Society of Chemistry*.

Kaletta T., Hengartner M. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5-5, 387-398.

Karou, D., Dicko, M. H., Simpore, J., & Traore, A. S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 823–828.

<https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3164>.

Karunasiri, N., Gunawardane, M., Senanayake, M., Jayathilaka, N., Seneviratne, N. (2020). Antioxidant and Nutritional Properties of Domestic and Commercial Coconut Milk Preparations. *International Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1155/2020/3489605>.

Kehinde B. A., Panghal A., Garg M. K., Sharma P., Chhikara N. (2020). Vegetable milk as probiotic and prebiotic foods. *Adv Food Nutr Res*. 94:115-160.

<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.003>.

Kelder T., Stroeve J.H., Bijlsma S., Radonjic M., Roeselers G. (2014). Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. *Nutr Diabetes*. 4(6):e122.

<https://doi.org/10.1038/nutd.2014.18>.

Kim J.A., Wei Y., Sowers J.R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.* 102(4):401-14.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165472>.

Klaver, A. & van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology.* 59(4), 1120–1124. <https://doi.org/10.1002/bit.260410811>.

Kochikuzhyil, M., Devi, K., Fattepur, R. (2010). Effect of saturated fatty acid-rich dietary vegetable oils on lipid profile, antioxidant enzymes and glucose tolerance in diabetic rats. *Indian J Pharmacol.* 42(3):142-5.  
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.66835>.

Koh, W. Y., Utra, U., Rosma, A., Effarizah, M. E., Rosli, W. I. W., & Park, Y. H. (2018). Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach. *Food Science and Biotechnology,* 27(2), 525–535.  
<https://doi.org/10.1007/s10068-017-0245-5>.

Kumar A., Joishy T., Das S., Kalita M.C., Mukherjee A.K., Khan M.R. (2022). A potential probiotic *Lactobacillus plantarum* JBC5 improves longevity and healthy aging by modulating antioxidative, innate immunity and serotonin-signaling pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants.* 11:268.  
<https://doi.org/10.3390/antiox11020268>.

- Kunyeit, L., Kurrey, N., Anu-Appaiah, K.A. And Rao, R.P. (2019). Probiotic Yeasts Inhibit Virulence of Non -albicans Candida Species. *MBio – ASM journal*. 19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02307-19>.
- Kwon, K., & Rhee, K. (1996). Emulsifying capacity of coconut proteins as a function of salt, phosphate, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73(12), 1669– 73.
- Ikeda T., Yasui C., Hoshino K., Arikawa K., Nishikawa Y. (2007). Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *salmonella enterica* serovar enteritidis. *Appl Environ Microbiol*. 73(20):6404-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00704-07>.
- Lapierre L.R., Hansen M. (2012). Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 23(12):637-44. <https://10.1016/j.tem.2012.07.007>.
- Laureys, D., Leroy, F., Hauffman, T., Raes, M., Aerts, M., Vandamme, P., De Vuyst, L. (2021). The Type and Concentration of Inoculum and Substrate as Well as the Presence of Oxygen Impact the Water Kefir Fermentation Process. *Front. Microbiol*. 12, 628599. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628599>.
- Li H.Y., Zhou D.D., Gan R.Y., Huang S.Y., Zhao C.N., Shang A., Xu X.Y., Li H.B. (2021). Effects and Mechanisms of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics on Metabolic Diseases Targeting Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients*. 13(9): 1-22.

- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. (2018) Oxidative stress, aging and diseases. *Clin Interv Aging*. 13:757-772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- Liu J.R., Chen M.J., Lin C.W. (2005). Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. *J. Agric. Food Chem.* 53:2467–2474. <https://doi.org/10.1021/jf048934k>.
- Loki A.L., Rajamohan T. (2003). Hepatoprotective and antioxidant effect of tender coconut water on carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Indian J Biochem Biophys.* 40(5):354-7.
- Lopitz, O., Rementeria, A., Elguezabal, N., and Garaizar, J. (2006). Kefir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables. *Rev. Iberoam. Micol.* 23, 67–74. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70016-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70016-X).
- Łopusiewicz, Ł., Drozłowska, E., Siedlecka, P., Mężyńska, M., Bartkowiak, A., Sienkiewicz, M., Zielińska-Bliźniewska, H., & Kwiatkowski, P. (2019). Development, characterization, and bioactivity of non-dairy kefir-like fermented beverage based on flaxseed oil cake. *Foods*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/foods8110544>.
- Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 489(7415):220-30. <https://doi.org/10.1038/nature11550>.

- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. In *Cytokine* (Vol. 42, Issue 2, pp. 145–151). Cytokine. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., Arendt, E. K. (2021). An Update on Water Kefir: Microbiology, Composition and Production. *Int. J. Food Microbiol.* 345, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046–2056. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2603>.
- Malesza I.J., Malesza M., Walkowiak J., Mussin N., Walkowiak D., Aringazina R., Bartkowiak-Wieczorek J., Mądry E. (2021). High-fat, western-style diet, systemic inflammation, and gut microbiota: A narrative review. *Cells*,10:3164. <https://doi.org/10.3390/cells10113164>.
- Mandal, D., Mandal, S. (2011). Coconut (Cocos nucifera L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. *Asian Pac J Trop Med.* 4(3):241-7. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60078-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60078-3).
- Mangge H., Summers K., Almer G., Prassl R., Weghuber D., Schnedl W., Fuchs D. Antioxidant Food Supplements and Obesity-Related Inflammation. *Curr. Med. Chem.* 20:2330–2337. <https://doi.org/10.2174/0929867311320180004>.
- Mantzourani, I., Terpou, A., Bekatorou, A., Mallouchos, A., Alexopoulos, A., Kimbaris, A., Bezirtzoglou, E., Koutinas, A. A., & Plessas, S. (2020).

Functional pomegranate beverage production by fermentation with a novel synbiotic *L. paracasei* biocatalyst. *Food Chemistry*, 308, 125658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125658>.

Matés J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 153(1-3):83–104. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00306-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00306-1).

Mauro C. S. I., Fernandes M. T. C., Farinazzo F. S., Garcia S. (2022). Characterization of a fermented coconut milk product with and without strawberry pulp. *J Food Sci Technol*. 59(7):2804-2812. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05303-1>.

Mauro C. S. I., Garcia S. (2019). Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. *J Food Sci Technol*. 56(2):854-864. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3545-8>.

Mazein, A., Griffiths, W., Freeman, T., Ghazal, P., Mazein, A., Watterson, S., Gibbs, H., Hsieh, W., Abdullah, B., Blanc, M. (2011). Regulation and feedback of cholesterol metabolism. *Nature Precedings*. 59(2), 473–474. <https://doi.org/10.1038/npre.2011.6315>.

Mechmeche, M., Kachouri, F., Ksontini, H., Setti, K., & Hamdi, M. (2018). Bioprocess development and preservation of functional food from tomato seed isolate fermented by kefir culture mixture. *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 3911–3921. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3315-7>.

- M'Hir, S., Rtibi, K., Mejri, A., Ziadi, M., Aloui, H., Hamdi, M., & Ayed, L. (2019). Development of a Novel Whey Date Beverage Fermented with Kefir Grains Using Response Surface Methodology. *Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2019/1218058>.
- McCarthy, S., Parker, M., Ameerally, A., Drake, L., Drake, A. (2017). Drivers of choice for fluid milk versus plant-based alternatives: What are consumer perceptions of fluid milk? *J Dairy Sci.* 125 - 6138. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12519>.
- Mell, B., Jala, V. R., Mathew, A. V., Byun, J., Waghulde, H., Zhang, Y., Haribabu, B., Vijay-Kumar, M., Pennathur, S., & Joe, B. (2015). Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiological Genomics*, 47(6), 187–197. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00136.2014>.
- Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>.
- Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Rufián-Henares, J. Á., Martínez, R. G., Miralles, B., Bergillos, T., Navarro-Alarcón, M., & Jauregi, P. (2017). Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: Activity and physicochemical property relationship of the peptide components. *Food and Function*, 8(8), 2783–2791. <https://doi.org/10.1039/c7fo00666g>.

Mottawea, W., Chiang, C. K., Mühlbauer, M., Starr, A. E., Butcher, J., Abujamel, T., Deeke, S. A., Brandel, A., Zhou, H., Shokralla, S., Hajibabaei, M., Singleton, R., Benchimol, E. I., Jobin, C., Mack, D. R., Figeys, D., & Stintzi, A. (2016). Altered intestinal microbiota-host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease. *Nature Communications*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms13419>.

Nevin K.G., Rajamohan T. (2005). Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food Chem.* 99: 260-266.

Ostadrhimi, A., Taghizadeh, A., Mobasseri, M., Farrin, N., Payahoo, L., Beyramalipoor Gheshlaghi, Z., Vahedjabbari, M. (2015). Effect of Probiotic Fermented Milk (Kefir) on Glycemic Control and Lipid Profile in Type 2 Diabetic Patients: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Iran. J. Public Health.* 44 (2), 228–237.

Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D. L., Schieber, A., & Gänzle, M. G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9214–9220. <https://doi.org/10.1021/jf101504v>.

Otles, S., & Cagindi, O. (2003). Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54–59. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.54.59>.

Ozcan, T., Sahin, S., Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L. (2018). Assessment of antioxidant capacity by method comparison and amino acid



characterisation in buffalo milk kefir. *International Journal of Dairy Technology*. 72-1, 65–73. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12560>.

Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 20:1013–1022. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>.

Palou A., Serra F., Pico C. (2003). General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *Eur J Clin Nutr.* 1:S12-7. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601822>.

Pan, D., Zeng, Q., Yan, T. (2011). Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of the Science of Food & Agriculture*. 91(3), 512–518. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4214>.

Pamukcu B., Lip G.Y., Shantsila E. (2011). The nuclear factor--kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb Res.* 128(2):117-23. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.03.025>.

Parekh P.J., Balart L.A., Johnson DA. (2015). The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 6(6):e91. <https://doi.org/10.1038/ctg.2015.16>.

Park, M. R., Ryu, S., Maburutse, B. E., Oh, N. S., Kim, S. H., Oh, S., Jeong, S. Y., Jeong, D. Y., Oh, S., & Kim, Y. (2018). Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of

Caenorhabditis elegans through a nuclear hormone receptor. *Scientific reports*. 8(1), 7441.

Park, M. R., Yun, H. S., Son, S. J., Oh, S., & Kim, Y. (2014). Short communication: Development of a direct in vivo screening model to identify potential probiotic bacteria using *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6828–6834. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8561>.

Park-Windhol, C., & D'Amore, P. A. (2016). Disorders of Vascular Permeability. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 11, pp. 251–281). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044506>.

Pawluk, H., Pawluk, R., Robaczewska, J., Kędziora-Kornatowska, K., & Kędziora, J. (2017). Biomarkers of antioxidant status and lipid peroxidation in elderly patients with hypertension. *Redox Report*, 22(6), 542–546. <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1372072>.

Peluso I., Palmery M., Pérez-Jiménez J., Drummen G. (2016). Biomarkers of Oxidative Stress in Experimental Models and Human Studies with Nutraceuticals: Measurement, Interpretation, and Significance. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:6159810. <https://doi.org/10.1155/2016/6159810>.

Pereira, D., Gibson, R. (2002). Cholesterol assimilation by Lactic acid bacteria and Bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(9), 4689–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002>.

- Perez Diaz, M., Breidt, F., Buescher, W. (2014). Fermented and acidified vegetables: compendium of methods for the microbiological examination of foods. in *Microbial Control and Food Preservation: Theory and Practice*. Eds: Springer, USA.
- Perkins N.D., Gilmore T.D. (2006). Good cop, bad cop: The different faces of NF- $\kappa$ B. *Cell Death Differ.* 13:759–772. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401838>.
- Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 30(1):11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.
- Pisoschi A.M., Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 97:55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- Pontonio, E., Montemurro, M., Pinto, D., Marzani, B., Trani, A., Ferrara, G., Mazzeo, A., Gobbetti, M., & Rizzello, C. (2019). Lactic Acid Fermentation of Pomegranate Juice as a Tool to Improve Antioxidant Activity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1550. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01550>.
- Powers S.K., Ji L.L., Kavazis A.N., Jackson M.J. (2011). Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 1(2):941–969. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100054>.
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Carlos R Soccol. (2015). Milk Kefir: Composition, Microbial Cultures, Biological Activities, and Related Products. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1177.

- Rafie, N.; Hamedani, S. G.; Ghiasv, R.; Miraghajani, M. (2015). Kefir and Cancer: A Systematic Review of Literatures. *Arch. Iran. Med.* 18 (12), 852–857. <https://doi.org/0151812/AIM.001>.
- Rajah Kumar, M., Keong Yeap, S., Mohamad, N. E., Abdullah, J. O., Masarudin, M. J., Khalid, M., Thean, A., Leow, C., Alitheen, N. B. (2021). Metagenomic and Phytochemical Analyses of Kefir Water and Its Subchronic Toxicity Study in BALB/c Mice. *BMC Complement Med Ther* 21, 183 <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03358-3>.
- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M. A., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L. (2016). Development of New Non-Dairy Beverages from Mediterranean Fruit Juices Fermented with Water Kefir Microorganisms. *Food Microbiol.* 54, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.018>.
- Rangsinth P, Prasansuklab A, Duangjan C, Gu X, Meemon K, Wink M, Tencomnao T. (2019). Leaf extract of *Caesalpinia mimosoides* enhances oxidative stress resistance and prolongs lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complement Altern Med.* 8;19(1):164. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2578-5>.
- Rasika D. M. D., Munasinghe M. D., Vidanarachchi J. K., da Cruz A. G., Ajlouni S., Ranadheera C. S. (2020). Probiotics and prebiotics in non-bovine milk. *Adv Food Nutr Res.* 94:339-384. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.008>.
- Rasyid, F., Manullang, M., & Hansen, P. (1992). Isolation and characterization of

- coconut protein. *Food Hydrocolloids*. 6(3), 301– 14.  
[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80097-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80097-0).
- Ren, Y., Qu, M., Yang, L., An, B., Wang, C., Feng, R. (2019). Screening and degradation mechanism of cholesterol-lowering lactic acid bacteria in traditional fermented foods in northeast China. *Food Science*. 40(22), 199–206. <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20181126-295>.
- Repa, J., Berge, E., Pomajzl, C., Richardson, A., Hobbs, H., Mangelsdorf, J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*. 277(21), 18793–18800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109927200>.
- Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 49(11):1603-16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- Rezaie A., Parker R.D., Abdollahi M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci*. 52(9):2015-21. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9622-2>.
- Ricci, A., Cirilini, M., Calani, L., Bernini, V., Neviani, E., Rio, D. Del, Galaverna, G., & Lazzi, C. (2019). In vitro metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 276, 692–699.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.046>.
- Riddle D.L., Blumenthal T., Meyer B.J. (1997). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor. *Laboratory Press*.

- Rigottier-Gois L. (2013). Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J.* 7(7):1256-61. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.80>.
- Rodrigues K.L., Araújo T.H., Schneedorf J.M., de Souza Ferreira C., de Oliveira Isac Moraes G., Coimbra R.S., Rodrigues M.R. (2016). A Novel Beer Fermented by Kefir Enhances Anti-Inflammatory and Anti-Ulcerogenic Activities Found Isolated in Its Constituents. *J. Funct. Foods.* 21:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.035>.
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., Peluzio, M. D. C. G. (2017). (2017). Milk Kefir: Nutritional, Microbiological and Health Benefits. *Nutr. Res. Rev.* 30 (1), 82–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>.
- Rutkowska J., Antoniewska-Krzeska A., Żbikowska A., Cazón P., Vázquez M. (2022). Volatile Composition and Sensory Profile of Lactose-Free Kefir, and Its Acceptability by Elderly Consumers. *Molecules.* 2022. 27(17):5386. <https://doi.org/10.3390/molecules27175386>.
- Sabokbar, N., & Khodaiyan, F. (2016). Total phenolic content and antioxidant activities of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 739–747. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2029-3>.
- Sadeq Hasan Al-Sheraji, Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusofa, R. M., & Hassana, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553.

- Salil, G., Nevin, G., Rajamohan, T. (2011). Arginine rich coconut kernel protein modulates diabetes in alloxan treated rats. *Chem Biol Interact.* 189(1-2):107-11. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.10.015>.
- Salisbury D., Bronas U. (2015). Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nurs Res.* 64(1):53–66. <https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000068>.
- Savoia, C., Sada, L., Zezza, L., Pucci, L., Lauri, F. M., Befani, A., Alonzo, A., & Volpe, M. (2011). Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. In *International Journal of Hypertension* (Vol. 2011). *Int J Hypertens.* <https://doi.org/10.4061/2011/281240>.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>.
- Schouest K., Zitova A., Spillane C., Papkovsky D. (2009). Toxicological assessment of chemicals using *Caenorhabditis elegans* and optical oxygen respirometry. *Environ Toxicol Chem.* 28, 4, 791-799.
- Segawa, S., Wakita, Y., Hirata, H., & Watari, J. (2008). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.023>.

- Seow, C., Gwee, N. (1997). Review coconut milk: chemistry and technology. *Int J Food Sci Technol.*32:189–201. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1997.00400.x>.
- Sethi, S., Tyagi, K., Anurag, K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *J Food Sci Technol.* 53:3408–3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>.
- Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., Sheikhi, A. (2017). Kefir: A Powerful Probiotics with Anticancer Properties. *Med. Oncol.* 34 (11), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1044-9>.
- Schenk S., Saberi M., Olefsky J.M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 118(9):2992-3002. <https://doi.org/10.1172/JCI34260>.
- Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., Sheikhi, A. (2017). Kefir: A Powerful Probiotics with Anticancer Properties. *Med. Oncol.*, 34 (11), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1044-9>.
- Sheela, L., Nazeem, A., Narayanankutty, A., Shylaja, M., Davis, P., James, P., Valsalan, R., Devassy, Babu, T., Raghavamenon, C. (2017). Coconut phytocompounds inhibits polyol pathway enzymes: Implication in prevention of microvascular diabetic complications. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 127:20-24. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.10.004>.
- Sikora E., Scapagnini G., Barbagallo M. (2010). Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun. Ageing.* 7:1–4. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-7-1>.



- Siriphanich J, Saradhuldhat P, Romphophak T, Krisanapook K, Pathaveerat S, Tongchitpakdee S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. 8–35. <https://doi.org/10.1533/9780857092885.8>.
- Sykiotis G.P., Bohmann D. (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell*. 14(1):76-85. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.002>.
- Sonnenburg E.D., Smits S.A., Tikhonov M., Higginbottom S.K., Wingreen N.S., Sonnenburg J.L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*. 529(7585):212-5. <https://doi.org/10.1038/nature16504>.
- Srinivasan K.S., Indira K., Chandrasekhara M. R. (1964). Amino acid composition & electrophoretic behaviour of coconut proteins. *Indian J Biochem*. 1(3):146-8.
- Stadie J., Gulitz A., Ehrmann M.A., Vogel R.F. (2013). Metabolic Activity and Symbiotic Interactions of Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from Water Kefir. *Food Microbiol*. 35:92–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>.
- Sun, W., Yan, C., Frost, B., Wang, X., Hou, C., Zeng, M., Gao, H., Kang, Y., & Liu, J. (2016). Pomegranate extract decreases oxidative stress and alleviates mitochondrial impairment by activating AMPK-Nrf2 in hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. *Scientific Reports*, 6(February), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep34246>.

- Sunarti S., Nurliyani N., Tyas A.S.A., Kristian S.D., Prasetyastuti P. (2015). The Influence of Goat Milk and Soybean Milk Kefir on Il-6 and Crp Levels in Diabetic Rats. *Rom. J. Diabetes Nutr. Metab. Dis.* 22:261–267. <https://doi.org/10.1515/rjdnmd-2015-0032>.
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *In Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 17,11, 687–701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>.
- Tansakul A., Chaisawang P. (2005). Thermophysical properties of coconut milk. *Journal of Food Engineering.* 73, 276-280. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.035>.
- Tobajas, M., Mohedano, F., Casas, A., Rodríguez, J. (2007). Um estudo cinético da produção de reuterina por *Lactobacillus reuteri* PRO 137 em células em repouso. *Biochem Eng J.* 35:218–225. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.017>.
- Tobias, P. S., Soldau, K., Gegner, J. A., Mintz, D., & Ulevitch, R. J. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *Journal of Biological Chemistry*, 270(18), 10482–10488. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10482>.
- Traina G., Menchetti L., Rappa F., Casagrande-Proietti P., Barbato O., Leonardi L., Carini F., Piro F., Brecchia G. (2016). Probiotic mixture supplementation

in the preventive management of trinitrobenzenesulfonic acid-induced inflammation in a murine model. *J Biol Regul Homeost Agents*.30(3):895-901. PMID: 27655518.

Tomasello G., Tralongo P., Damiani P., Sinagra E., Di Trapani B., Zeenny M.N., Hussein I.H., Jurjus A., Leone A. (2014). Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: changes in response of colocytes. *World J Gastroenterol*. 20(48):18121-30. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18121>.

Touyz R.M., Deschepper C., Park J.B., He G., Chen X., Neves M.F., Virdis A. Schiffrin E.L. (2002). Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 20: 1127-1134. <https://doi.org/10.1097/00004872-200206000-00024>.

Touyz R.M. (2000). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2(1):98-105. <https://doi.org/10.1007/s11906-000-0066-3>.

Tralongo P., Tomasello G., Sinagra E., Damiani P., Leone A., Palumbo V. D., Giammanco M., Di Majo D., Damiani F., Abruzzo A., Bruno A., Cassata G., Cicero L., Noto M., Tomasello R., Lo Monte AI. (2014). The role of butyric acid as a protective agent against inflammatory bowel diseases. *Euromediterranean Biomedical Journal*. 9(4):24-35.

- Turrens J., Boveris A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 191 (2): 421–427. <https://doi.org/10.1042/bj1910421>.
- Valero-Cases, E., Cerdá-Bernad, D., Pastor, J. J., & Frutos, M. J. (2020). Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. *In Nutrients.* 12, 6. <https://doi.org/10.3390/nu12061666>.
- Venditti P., Stefano L., Di Meo S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion.* 13:71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>.
- Venkataraman K., Khurana S., Tai T.C. (2013). Oxidative stress in aging - matters of the heart and mind. *Int J Mol Sci.* 14(9):17897-925. <https://doi.org/10.3390/ijms140917897>.
- Verce, M., De Vuyst, L., Weckx, S. (2019). Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. *Front. Microbiol.* 10 (479). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>.
- Verhaar, B. J. H., Prodan, A., Nieuwdorp, M., & Muller, M. (2020). Gut Microbiota in Hypertension and Atherosclerosis: A Review. *Nutrients*, 12(10), 2982. <https://doi.org/10.3390/nu12102982>.
- Verni, M., Verardo, V., & Rizzello, C. G. (2019). How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. *In Foods MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* <https://doi.org/10.3390/foods8090362>.

- Verón, H. E., Gauffin Cano, P., Fabersani, E., Sanz, Y., Isla, M. I., Fernández Espinar, M. T., Gil Ponce, J. V., & Torres, S. (2019). Cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice fermented with autochthonous *Lactobacillus plantarum* S-811. *Food and Function*, *10*(2), 1085–1097. <https://doi.org/10.1039/c8fo01591k>.
- Vieira C.P., Rosario S., Lelis C. A., Rekowsky B. S., Carvalho A., Rosário D. K. A., Elias T. A., Costa M. P., Foguel D., Conte-Junior C. A. (2021). Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxid Med Cell Longev*. 2021:9081738. <https://doi.org/10.1155/2021/9081738>.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5315–5321. <https://doi.org/10.1021/jf0009293>.
- Vrins, J., van der Velde, E., van den Oever, K., Levels, M., Huet, S., Oude Elferink, J., Kuipers, F., & Groen, K. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *Journal of Lipid Research*. *50*(10), 2046–2054. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800579-JLR200>.
- Wang Vanhoutte, M., Shimokawa, H., Tang, H., Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. *196*(2):193-222. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x>.
- Wang, X., & Gibson, G. R. (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine.

*Journal of Applied Bacteriology*. 75(4), 373–380.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02790.x>.

Wang, Y., Chen, N., Lo, M., Chiang, L., Chen, C., Liu, R. (2012). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiol.* 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.001>.

WHO. (2000). Silent killer, global public health crisis. World Health Organization. [www.who.int](http://www.who.int).

Wollenhaupt S.G., Soares A.T., Salgueiro W.G. (2014). Seleno- and telluroxylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 64, 192-199.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249(4975), 1431–1433. <https://doi.org/10.1126/science.1698311>.

Wu J.Q., Kosten T.R., Zhang X.Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 46:200-6. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>.

Yan, Q., Gu, Y., Li, X., Yang, W., Jia, L., Chen, C., Han, X., Huang, Y., Zhao, L., Li, P., Fang, Z., Zhou, J., Guan, X., Ding, Y., Wang, S., Khan, M., Xin, Y., Li, S., & Ma, Y. (2017). Alterations of the gut microbiome in hypertension. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(AUG), 381. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00381>.

- Ye, J.-H., Huang, L.-Y., Terefe, N. S., & Augustin, M. A. (2019). Fermentation-based biotransformation of glucosinolates, phenolics and sugars in retorted broccoli puree by lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 286, 616–623.
- Yoon, S., Lee, H., Cha, S. (2018). Measurement of Intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate. *Bio Protoc.* 8(6): 2774-82.
- Yu, L., Hammer, E., Li-Hawkins, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, C., Hobbs, H. (2002). Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99(25), 16237–16242.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.252582399>
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K. (2010). Liver X receptor in cholesterol metabolism. *The Journal of Endocrinology.* 204(3), 233–240.  
<https://doi.org/10.1677/JOE-09-0271>.
- Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C., and Huang, Y. (2013). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains. *PLoS ONE.* 8:e69868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069868>.
- Zielińska-Bliźniewska H., Sitarek P., Merecz-Sadowska A., Malinowska K., Zajdel K., Jabłońska M.R., Śliwiński T., Zajdel R. (2019). Plant Extracts and Reactive Oxygen Species as Two Counteracting Agents with Anti- and Pro-Obesity Properties. *Int. J. Mol. Sci.* 20:4556.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184556>.