UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARLUCI PALAZZOLLI DA SILVA

**Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo
contendo micro-organismos probióticos na forma livre e
encapsulada**

Pirassununga

2016

MARLUCI PALAZZOLLI DA SILVA

**Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo
contendo micro-organismos probióticos na forma livre e
encapsulada**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade.

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d Silva, Marluci Palazzolli
Desenvolvimento e caracterização de chocolate
meio amargo contendo micro-organismos probióticos na
forma livre e encapsulada / Marluci Palazzolli
Silva ; orientadora Carmen Silvia Fávaro Trindade. --
Pirassununga, 2016.
126 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. Lactobacillus. 2. Bifidobacterium. 3. Spray
chilling. 4. Partícula lipídica. 5. Cacau. I. Fávaro
Trindade, Carmen Sílvia, orient. II. Título.

*Aos meus pais Marcelo e Maria pelos conselhos e
apoio, sempre incentivadores dos meus estudos.*

BIOGRAFIA

Marluci Palazzolli da Silva, filha de Marcelo Santos da Silva e Maria Aparecida Palazzolli da Silva, nasceu em 02 de Outubro de 1988, na cidade de Itu, no estado de São Paulo, Brasil.

Graduada em Engenharia de Alimentos pela Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos na Universidade de São Paulo (FZEA/USP) em 2012. Durante o curso foi duas vezes bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq na área de Microbiologia de Alimentos.

Após a graduação, trabalhou em indústria de produtos lácteos por dois anos, atuando principalmente na melhoria das linhas produtivas, gerenciamento de indicadores fabris, padronização de processos e treinamentos na área da qualidade.

Ingressou em 2014 no curso de mestrado da pós-graduação em Engenharia de Alimentos na FZEA/USP, com projeto na área de encapsulação de probióticos orientado pela Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade. Em 2015, estagiou pelo período de 6 meses na L'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique. O objetivo do estágio foi encapsular probióticos por co-extrusão seguido por secagem em leiteo fluidizado, sendo supervisionado pelo Prof. Dr. Denis Poncelet. A bolsa de mestrado regular e a bolsa de estágio no exterior foram concedidas pela FAPESP (#2014/10754-5 e #2015/15300-5).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa oportunidade em minha vida, por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, e também pelos momentos de dificuldades que foram revertidos em aprendizado.

A Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade, que é uma grande inspiração pela sua dedicação a área acadêmica, muito obrigada pela orientação e apoio durante essa trajetória. Seus conselhos e experiências foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de estudos de mestrado (#2014/10754-5) e de estágio no exterior (#2015/15300-5), assim como o suporte financeiro para realização desse trabalho.

Ao Dr. Valdecir Luccas e aos funcionários do Cereal Chocotec do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, pela atenção e orientação durante a elaboração das amostras de chocolate.

Às empresas Barry Callebout, Triângulo Alimentos e Sacco que doaram materiais para o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Funcionais (LAPROF), que sempre quando precisei de ajuda estiveram presentes.

Ao especialista Marcelo Thomazini, obrigada pelo auxílio e orientação durante a realização dos experimentos.

Gostaria de agradecer também aos funcionários, técnicos e especialistas do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Biblioteca da FZEA e do serviço de pós-graduação.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Teresa de Alvarenga Freire e a Profa. Dra. Fernanda Maria Vanin, que me aceitaram como aluna do Programa de Aperfeiçoamento e Ensino (PAE) em suas disciplinas no curso de graduação em Engenharia de Alimentos, vocês se tornaram grandes exemplos para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Denis Poncelet, que me aceitou como aluna de intercâmbio e me orientou durante o estágio na França. Agradeço também aos funcionários da L'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique que me auxiliaram durante os meus experimentos.

Agradeço em especial aos meus pais e ao João Paulo, que mesmo com a distância sempre apoiaram os meus sonhos.

Muito obrigada.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

SILVA, M.P. **Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo contendo micro-organismos probióticos na forma livre e encapsulada**. 2016. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o chocolate meio amargo, uma matriz alimentícia pouco explorada no mercado de produtos probióticos, porém muito atrativa para os consumidores, para a adição de *Lactobacillus acidophilus* (LA3) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BLC1) na forma livre ou encapsulada. Na primeira etapa do trabalho, micropartículas sólidas lipídicas (MSL) foram produzidas por *spray chilling* ou recobertas por interação eletrostática dos polímeros (PLRIE), sendo em seguida caracterizadas para verificar se os métodos de encapsulação foram eficientes para a proteção dos probióticos. Na segunda etapa, foram elaboradas e caracterizadas amostras de chocolate meio amargo adicionadas dos probióticos nas formas livre ou encapsulada por *spray chilling*. Além disso, os produtos foram avaliados sensorialmente por 100 provadores para verificar sua aceitação sensorial. Em relação ao ensaio de sobrevivência dos micro-organismos aos fluidos gastrointestinais simulados, as contagens das populações de LA3 e BLC1 livres, antes de serem aplicados em chocolate, reduziram respectivamente 2,5 e 4 log UFC/g. Após a aplicação dos probióticos em chocolate meio amargo, LA3 e BLC1 livres apresentaram reduções em suas populações de 0,25 e 0,30 log UFC/g, respectivamente, sendo que ambas as contagens das populações encapsuladas apresentaram um decréscimo de aproximadamente 0,50 e 1,10 log UFC/g. Após 120 dias de estocagem do chocolate a 25 °C, as contagens das populações de LA3 e BLC1, na forma livre, apresentaram reduções de 1,40 e 0,70 log UFC/g, enquanto que para as populações dos micro-organismos encapsulados, as contagens foram abaixo do limite de detecção do método. As amostras de chocolate apresentaram a_w abaixo de 0,6, pH entre 5,77 – 5,87, teor de gordura e de fenólicos, respectivamente de 34% e 15 mg de ácido gálico equivalente/g de chocolate. Em relação à textura, foi verificado que todas as amostras de chocolate apresentaram um ligeiro incremento da dureza após o período de armazenamento. Por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi visualizada a presença de cristais de gordura, *fat bloom*, após 120 dias de estocagem em todas amostras de chocolate, o que pode ser relacionado também com o aumento do índice de brancura. Na avaliação sensorial, todas as amostras apresentaram nota

de aceitação acima de 7,1, na escala hedônica de 9 pontos. Além disso, todos os produtos apresentaram pelo menos 75% de intenção de compra. Portanto, demonstrou-se que o chocolate meio amargo é uma ótima matriz alimentícia devido a sua composição e características físico-químicas para incorporação de probióticos, não sendo necessária a refrigeração do produto para manter a população dos probióticos durante esse período de estocagem, somando-se ao fato do produto não ter sido alterado sensorialmente após a adição dos micro-organismos probióticos.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. *Bifidobacterium*. *Spray chilling*. Partícula lipídica. Cacau. Fenólicos.

ABSTRACT

SILVA, M.P. **Development and characterization of semisweet chocolate containing probiotic microorganisms in free form and encapsulated.** 2016. 126 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The aim of this study was to evaluate the semisweet chocolate, a food matrix little explored in the market of probiotic products, however, very attractive for consumers, for the addition of *Lactobacillus acidophilus* (LA3) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BLC1) in free form or encapsulated. In the first stage of the work, solid lipid microparticles (SLM) were produced by spray chilling or covered by electrostatic interaction of polymers (LPCEI), and then characterized to verify if encapsulation methods were efficient for the protection of probiotic cells. In the second stage, semisweet chocolate samples added of probiotics in free form or encapsulated by spray chilling were prepared and characterized. Moreover, the products were evaluated sensorially by 100 panelists to verify their global acceptance. With respect to the test of microorganism survival to simulated gastrointestinal fluids, the counts of LA3 and BLC1 in free form, before being added to chocolate, have reduced respectively 2,5 and 4 log CFU/g. After the application of probiotics in semisweet chocolate, LA3 and BLC1 free have shown reductions in their populations of 0,25 and 0,30 log CFU/g, respectively, and both counts of encapsulated populations have decreased approximately 0,50 and 1,10 log CFU/g. After 120 days of storage of the chocolate at 25 ° C, the counts of LA3 and BLC1 in free form showed reductions of 1,40 and 0,70 log CFU/g, while in the populations of encapsulated microorganisms, the counts were below method detection limit. The samples of chocolate presented a_w below 0,6, pH between 5,77 to 5,87, fat and phenolic, respectively, 34% and 15 mg gallic acid equivalent/g of chocolate. Concerning the texture, it has been found that all samples chocolate showed a slight increase in the hardness after storage. Scanning electron microscope (SEM) has been used to visualize the presence of fat crystals and all samples of chocolate presented fat bloom after 120 days of storage, which can also be correlated with the increase in whiteness index. Regarding the sensory evaluation, all samples have shown acceptance mark above 7,1, on a hedonic scale of 9 points. In addition, all products have had at least 75% of purchase intent. Therefore, it has been demonstrated that the semisweet chocolate is an excellent food matrix due to its composition and physical-

chemical properties for incorporation of probiotics, adding to the fact that is not necessary to cool the product to maintain the bacterial population during this storage period, as well as it has not been altered sensory after the addition of probiotics microorganisms.

Keywords: *Lactobacillus*. *Bifidobacterium*. *Spray chilling*. Lipid particle. Cocoa. Phenolics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais mecanismos de ação dos probióticos.	21
Figura 2 – Exemplos de alimentos e bebidas probióticas comercializadas no mercado mundial. Cada categoria está listada acima da imagem do produto.	26
Figura 3 – Tipos de estruturas obtidas após o processo de encapsulação.	30
Figura 4 – Representação esquemática do <i>spray chiller</i>	33
Figura 5 – Fluxograma proposto para o processamento do chocolate probiótico.	38
Figura 6 – Curva de temperagem do chocolate.	39
Figura 7 – Representação esquemática do cultivo das células bacterianas para obtenção do inóculo.	43
Figura 8 – Metodologia utilizada para produção das micropartículas lipídicas recobertas por coacervados.	46
Figura 9 – Representação esquemática da avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência dos probióticos aos fluidos gastrointestinais.	49
Figura 10 – Fluxograma do processamento de chocolate probiótico.	51
Figura 11 – Curva de padronização dos inóculos de <i>L. acidophilus</i> (LA3) e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BLC1).	58
Figura 12 – Adesão da parede celular dos probióticos estudados, LA3 – <i>L. acidophilus</i> e BLC1 – <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , em diferentes solventes, expressos como porcentagem (%).	59
Figura 13 – Imagem dos pós obtidos por (1) <i>spray chilling</i> e (2) por recobrimento por interação eletrostática seguido de liofilização.	61
Figura 14 – Microscopia óptica das micropartículas recobertas por interação eletrostática, (1) com uma lente de aumento de 40X e (2) com uma lente de aumento de 100X.	64
Figura 15 – Micrografias das micropartículas desidratadas produzidas por interação eletrostática, sendo (1) e (2) carregadas com <i>L. acidophilus</i> , (3) e (4) de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	65
Figura 16 – Micrografias das MSL carregadas com <i>L. acidophilus</i> (1 e 2, com aumento de 500x e 1.0kx, respectivamente) e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (3 e 4 com aumento de 500x).	66
Figura 17 – Distribuição do tamanho das micropartículas contendo probióticos.	68
Figura 18 – Análise da resistência dos probióticos encapsulados ou livres em diferentes valores de pH, no tempo inicial e após 3h de ensaio.	75

Figura 19 – Efeito da temperatura (T= 50 °C) na sobrevivência dos probióticos livres ou encapsulados, incubados por 60 min.	79
Figura 20 – Sobrevivência aos fluidos gástrico simulado (FGS), durante 120 min de incubação, e intestinal simulado (FIS), durante 180 min de incubação, para o micro-organismo <i>L. acidophilus</i> livre (LA-Livre), encapsulado por <i>spray chilling</i> (LA-SC) e recoberto por interação eletrostática (LA-RIE).	81
Figura 21 – Sobrevivência aos fluidos gástrico (FGS), durante 120 min de incubação, e intestinal simulado (FIS), durante 180 min de incubação, para o micro-organismo <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> livre (BLC-Livre), encapsulado por <i>spray chilling</i> (BLC-SC) ou em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (BLC-RIE).	82
Figura 22 – Aspecto das amostras de chocolate meio amargo probiótico.	84
Figura 23 – Dureza das amostras de chocolate, expressos em N, antes e após a estocagem de 120 dias à 25°C.	88
Figura 24 – Índice de brancura (IB) das amostras de chocolate antes e após o período de estocagem.	89
Figura 25 – Micrografias das amostras de chocolate probiótico, no tempo inicial (coluna esquerda) e após 120 dias (coluna direita) de estocagem.	90
Figura 26 – Sobrevivência dos probióticos livres (amostras 2 e 4) e encapsulados (amostras 3 e 5) acrescentados em chocolate meio amargo, quando adicionados em fluidos gastrointestinais simulados, expressos em log UFC/g.	97
Figura 27 – Perfil de preferências dos provadores das amostras de chocolate meio amargo. As porcentagens em cada quesito são referentes às respostas dadas pelos provadores em relação ao número total de participantes.	99
Figura 28 – Médias dos parâmetros avaliados nas amostras de chocolate meio amargo probiótico.	101
Figura 29 – Intenção de compra das amostras de chocolate.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações de probióticos em alimentos que foram pesquisadas recentemente.....	28
Tabela 2 – Estudos recentes sobre encapsulação de probióticos.....	31
Tabela 3 – Tratamentos das micropartículas produzidas por spray chilling ou recobertas por interação eletrostática.	41
Tabela 4 – Formulação das amostras de chocolate meio amargo probiótico.	42
Tabela 5 – Atividade de água (a_w) dos pós obtidos por recobrimento por interação eletrostática seguido por liofilização (RIE) ou produzidos por <i>spray chilling</i> (SC), logo após a produção e durante o armazenamento (dias) à 25 °C.	62
Tabela 6 – Médias dos tamanhos (μm) das partículas probióticas obtidas por <i>spray chilling</i> ou recobertas por interação eletrostática (RIE).	67
Tabela 7 – Enumeração das células viáveis durante a encapsulação por <i>spray chilling</i> , expressos em log UFC/g.....	69
Tabela 8 – Enumeração das células viáveis durante a encapsulação dos probióticos em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE), expressos em log UFC/g.....	70
Tabela 9 – Viabilidade dos micro-organismos encapsulados por <i>spray chilling</i> (SC) e em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE) durante a estocagem à -18 °C por 120 dias. Os valores estão expressos em log UFC/g.....	71
Tabela 10 – Viabilidade dos micro-organismos encapsulados por <i>spray chilling</i> (SC) e em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE) durante a estocagem a 25 °C por 120 dias. Os valores estão expressos em log UFC/g.....	73
Tabela 11 – Contagens dos probióticos encapsulados e não encapsulados, no início e depois de 3 h de incubação em diferentes concentrações de NaCl, expressos como log UFC/g.	78
Tabela 12 – Contagens dos probióticos encapsulados e não encapsulados, no início e depois de 3 h de incubação, em diferentes concentrações de sacarose, expressos como log UFC/g. .	78
Tabela 13 – Valores para atividade de água das amostras de chocolate estocadas a 25 °C por 120 dias.....	85
Tabela 14 – pH das amostras de chocolate estocadas a 25°C por 120 dias.	86
Tabela 15 – Teor total de fenólicos (TTF) e gordura (TTG) das amostras de chocolate estocadas a 25 °C (média $\pm$ desvio padrão).	87

Tabela 16 – Viabilidade dos probióticos livres (formulações 2 e 4) e encapsulados (formulações 3 e 5) adicionados em amostras de chocolate meio amargo durante a estocagem de 120 dias a 25°C. Os valores foram expressos como log UFC/g de chocolate.	95
Tabela 17 – Médias e desvio padrão dos atributos avaliados nas amostras de chocolate meio amargo probiótico. As notas foram dadas utilizando a escala hedônica de 9 pontos.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGE – Ácido gálico equivalente

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPF – Boas Práticas de Fabricação

DO – Densidade óptica

FGS – Fluido Gástrico Simulado

FIS – Fluido Intestinal Simulado

g – Gramas

GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro

h – Horas

IB – Índice de Brancura

L – Litros

Log – Logaritmo decimal

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg – Miligramas

mL – Mililitros

MRS – Man, Rogosa e Sharpe

MSL – Micropartícula sólida lipídica

N – Newton

pH – Potencial hidrogeniônico

PLRIEP – Partícula lipídica recoberta por interação eletrostática de polímeros

rpm – Rotações por minuto

TTF – Teor Total de Fenólicos

TTG – Teor Total de Gordura

UFC – Unidade Formadora de Colônia

°C – graus Celsius

a_w – atividade de água

HCl – Ácido clorídrico

NaOH – Hidróxido de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

SUMÁRIO

1	Introdução.....	19
2	Revisão Bibliográfica.....	21
2.1	Probióticos	21
2.2	Alimentos Probióticos.....	23
2.3	Encapsulação de Probióticos.....	28
2.3.1	<i>Spray Chilling</i>	32
2.3.1	Coacervação Complexa	34
2.4	Chocolate Probiótico.....	36
3	Objetivos	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	Material e Métodos.....	41
4.1	Materiais	41
4.2	Tratamentos	41
4.3	Métodos	42
4.3.1	Produção e caracterização das micropartículas probióticas	42
4.3.1.1	Preparo dos inóculos probióticos	42
4.3.1.2	Enumeração dos micro-organismos probióticos	43
4.3.1.3	Curva de padronização dos inóculos	44
4.3.1.4	Perfil de hidrofobicidade da parede celular dos probióticos	44
4.3.1.5	Microencapsulação dos probióticos por <i>spray chilling</i>	45
4.3.1.6	Microencapsulação dos probióticos em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros	46
4.3.1.7	Tamanho e distribuição das micropartículas	47
4.3.1.8	Caracterização morfológica por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
4.3.1.9	Avaliação da sobrevivência dos micro-organismos aos processos de encapsulação	47
4.3.1.10	Avaliação da viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem	48

4.3.1.11	Avaliação da resistência dos probióticos encapsulados sob diferentes condições de stress: pH, NaCl, sacarose e temperatura	48
4.3.1.12	Avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência dos probióticos livres e encapsulados aos fluidos gastrointestinais simulados	48
4.3.2	Produção do chocolate meio amargo probiótico	50
4.3.2.1	Preparação dos inóculos probióticos para aplicação em chocolate.....	50
4.3.2.2	Produção do chocolate meio amargo	50
4.3.2.3	Avaliação do diâmetro das partículas durante o refino	52
4.3.2.4	Índice de temperagem	52
4.3.3	Caracterização do chocolate meio amargo probiótico	52
4.3.3.1	Atividade de água e pH das amostras de chocolate	53
4.3.3.2	Determinação do teor total de gordura e fenólicos das amostras de chocolate.....	53
4.3.3.3	Cor superficial e dureza das amostras de chocolate	54
4.3.3.4	Morfologia da superfície das amostras de chocolate utilizando microscopia eletrônica de varredura	54
4.3.4	Análises microbiológicas das amostras de chocolate.....	54
4.3.4.1	Qualidade microbiológica das amostras de chocolate.....	54
4.3.4.2	Viabilidade dos probióticos em amostras de chocolate durante a estocagem a 25 °C.....	55
4.3.4.3	Sobrevivência dos probióticos livres e encapsulados em chocolate quando adicionados aos fluidos gastrointestinais simulados	56
4.3.4.4	Análise sensorial das amostras de chocolate.....	56
4.3.5	Análises estatísticas.....	57
5	Resultados e Discussão	58
5.1	Curva de padronização do inóculo.....	58
5.2	Perfil de hidrofobicidade da parede celular dos probióticos.....	59
5.3	Caracterização das micropartículas probióticas.....	60
5.3.1	Atividade de água	61
5.3.2	Caracterização morfológica das micropartículas probióticas.....	63
5.3.3	Tamanho médio e distribuição de tamanho das micropartículas probióticas.....	66
5.3.4	Avaliação da sobrevivência dos micro-organismos ao processo de encapsulação.....	68
5.3.5	Avaliação da viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem.....	70

5.3.6 Avaliação da resistência dos probióticos encapsulados ou livres em diferentes condições de stress: pH, NaCl, sacarose e temperatura	74
5.3.7 Avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência dos probióticos ao fluido gastrointestinal simulado.	80
5.4 Caracterizações das amostras de chocolate meio amargo probiótico	83
5.4.1 Atividade de água e pH das amostras de chocolate	84
5.4.2 Determinação do teor total de gordura e fenólicos das amostras de chocolate	86
5.4.3 Cor superficial e dureza das amostras de chocolate	88
5.4.4 Morfologia da superfície das amostras de chocolate utilizando microscopia eletrônica de varredura	90
5.5 Análises microbiológicas das amostras de chocolate	92
5.5.1 Qualidade microbiológica das amostras de chocolate.....	92
5.5.2 Viabilidade dos probióticos nas amostras de chocolate durante a estocagem a 25 °C	93
5.5.3 Sobrevivência dos probióticos livres e encapsulados em chocolate quando adicionados ao fluido gastrointestinal simulado	95
5.5.4 Análise sensorial das amostras de chocolate.....	98
6 Conclusões.....	104
7 Sugestões para trabalhos futuros	105
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE..	118
ANEXO.	123

1 Introdução

O termo probiótico pode ser definido como “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). Entretanto, para isso os micro-organismos probióticos precisam sobreviver ao processamento de alimentos e à passagem pelo trato gastrointestinal, desafiando a indústria de alimentos a encontrar novas alternativas para incorporá-los em alimentos. Alguns parâmetros como alta temperatura, variações de pH e oxigênio podem afetar a sobrevivência do probiótico (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014).

O processamento, estocagem e processo digestivo podem reduzir a viabilidade dos probióticos. Nesse sentido, a microencapsulação de probióticos objetiva proteger os micro-organismos das condições adversas do meio, e em alguns casos essa tecnologia permite a liberação do micro-organismo em condições específicas (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Algumas técnicas que vêm sendo empregadas para encapsulação de probióticos são: atomização, extrusão e coacervação complexa.

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, Pedroso et al. (2012, 2013) e Okuro et al. (2013), apresentaram resultados satisfatórios ao empregar a técnica de *spray chilling* para encapsulação de probióticos utilizando gordura vegetal, protegendo-os quando expostos as condições simuladas do trato gastrointestinal. Outra técnica estudada para a encapsulação dos probióticos foi a coacervação complexa, utilizando pectina e caseína, seguida pela secagem por atomização. Os micro-organismos encapsulados por essa técnica foram mais resistentes em condições ácidas, comparando com as culturas probióticas na forma livre (OLIVEIRA et al., 2007a). Dessa forma, considerando os resultados satisfatórios desses estudos, foram elaboradas partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros (PLRIEP), utilizando gelatina e goma arábica, assim como micropartículas sólidas lipídicas (MSL) por *spray chilling*, sendo caracterizadas e avaliadas ambas as estruturas para proteção dos probióticos.

A funcionalidade dos probióticos pode ser potencializada quando esses micro-organismos são incorporados em alguns alimentos, devido suas interações com os ingredientes, podendo proteger as células microbianas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; VINDEROLA et al. 2011). Neste contexto, os produtos lácteos são exaustivamente usados pela indústria de alimentos por

serem boas matrizes para veiculação dos probióticos. Entretanto, parte da população mundial não consome esses produtos devido à intolerância a lactose, alergia ao leite ou também devido a dietas que restringem o uso de proteína animal. Considerando os fatos mencionados, o chocolate meio amargo pode ser uma alternativa a esses produtos. Ademais o chocolate apresenta outras propriedades benéficas como a reconhecida atividade antioxidante (GADHIYA; PATEL; PRAJAPATI, 2015). Os compostos fenólicos presentes no chocolate podem desempenhar um papel importante em retardar o processo oxidativo em probióticos, o que é uma das principais causas do declínio da população desses micro-organismos em alimentos, melhorando a viabilidade dos probióticos e prolongando a vida de prateleira (BIALONSKA et al., 2010; CURIEL; MUNOZ; LOPEZ DE FELIPE, 2010; PEREIRA et al., 2013). Além disso, de acordo com Lahtinen et al. (2007) e Pedroso et al. (2013), a manteiga de cacau pode proteger os micro-organismos probióticos da água e íons H⁺. Outros estudos também verificaram o potencial do chocolate ao leite e amargo estocados em temperaturas de refrigeração, entre 4 °C e 20 °C, para incorporação de probióticos (FOONG et al., 2013; LALICIC-PETROJEVIC et al., 2015; MANDAL et al., 2013; NEBESNY et al., 2007; POSSEMIERS et al., 2010). Entretanto, nenhum desses trabalhos verificou a viabilidade dos probióticos em chocolate meio amargo estocado em temperatura ambiente, que é a condição ideal para a manutenção das características físico-químicas do produto.

Dessa forma, a elaboração de chocolate meio amargo contendo probióticos apresenta potencial para um novo alimento funcional devido à combinação dos benefícios dos probióticos e dos compostos fenólicos presentes na matriz alimentícia. Assim, o objetivo do presente estudo foi encapsular e incorporar os probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 nas formas livres e encapsuladas, em chocolate meio amargo. Além disso, foram verificadas as influências dos probióticos na qualidade do chocolate, e da matriz alimentícia na viabilidade do probiótico durante a estocagem, assim como a sobrevivência *in vitro* em condições simuladas da passagem pelo sistema gastrointestinal.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Probióticos

O intestino humano apresenta trilhões de bactérias, as quais podem impactar positivamente na saúde do indivíduo, considerando a presença de quantidades adequadas das bactérias probióticas na microbiota intestinal. De acordo com a Resolução RDC nº 2 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2002), os probióticos são micro-organismos vivos capazes de melhorar a microbiota intestinal trazendo benefícios à saúde do indivíduo. Nesse sentido, os probióticos criam um ambiente favorável ao intestino, por meio dos seus mecanismos de ação, que dependerão de uma variedade de fatores, como o tipo da cepa utilizada, o hospedeiro e a alimentação. Entre os principais benefícios desses micro-organismos destacam-se a manutenção dos sistemas digestivo e imunológico saudável (HILL et al., 2014).

Os principais mecanismos de ação dos probióticos estão apresentados na Figura 1. Os probióticos podem melhorar a barreira epitelial promovendo a secreção de muco. Além disso, algumas cepas probióticas liberam peptídeos ativos, conhecidos também como bacteriocinas, contra bactérias, fungos e vírus, podendo estabilizar a barreira intestinal. Outras substâncias antimicrobianas também são produzidas pelos probióticos, como o ácido lático e acético que apresentam efeito inibitório em bactérias Gram-negativas. Dessa forma, os probióticos atuam de diversas maneiras interferindo na adesão dos patógenos na mucosa intestinal (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

Figura 1 – Principais mecanismos de ação dos probióticos.

Fonte: Própria autoria.

Os principais micro-organismos probióticos aplicados em alimentos são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que apresentam metabolismos microaerófilos e anaeróbios,

respectivamente (SAAD, 2006). Entretanto, é importante ressaltar que nem todos os micro-organismos pertencentes a esses gêneros são aprovados para aplicação em alimentos no Brasil. Dessa forma os probióticos aprovados para aplicação em alimentos são (ANVISA, 2016): *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. Portanto, o gênero *Lactobacillus* é predominante na lista de probióticos aprovados, além disso, apresenta mais de 100 espécies e subespécies, representando um papel multifuncional para a produção de alimentos, como culturas *starter* de produtos lácteos e probióticos (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Lactobacillus acidophilus é uma das espécies mais conhecidas do gênero, estando presente no trato gastrointestinal e vagina, de preferência em meios ácidos. Esse micro-organismo pode trazer diversos benefícios à saúde, como o tratamento de doenças gastrointestinais, competitividade com bactérias patogênicas, redução da biossíntese do colesterol, inibição de enzimas bacterianas intestinais que transformam pré-carcinógenos em carcinógenos ativos, pré-digestão da lactose e atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, *Candida albicans* e diversos fungos (OZOGUL; HAMED, 2016).

O gênero *Lactobacillus* geralmente é mais resistente que o gênero *Bifidobacterium* em meio ácido, e também é encontrado naturalmente em produtos fermentados, se adaptando muito bem em produtos lácteos (LEE; SALMINEN, 2009). Em relação às características dos *Lactobacillus*, esses micro-organismos são Gram-positivos, não apresentam mobilidade, não formam esporos e são intolerantes ao sal. O tamanho típico desse gênero é 0,6 – 0,9 µm de largura e 1,5 – 6 µm de comprimento. Apresentam como faixa de temperatura e pH ótimos para multiplicação variando respectivamente entre 35 – 40 °C e 5,5 – 6 (GOMES; MALCATA, 1999). Alguns exemplos de aplicação em alimentos demonstram a diversificação de produtos nos quais os *L. acidophilus* podem ser utilizados, como em sorvetes simbióticos à base de extrato de soja ou de isolado proteico do soro de leite, ricota de leite de cabra e queijo prato (MATIAS et al. 2016; MEIRA et al., 2015; CHAVES; GIGANTE, 2016).

Em relação às bifidobactérias, estudos demonstraram que algumas cepas podem apresentar potencial benéfico em reduzir a obesidade, os lipídios no sangue e o risco de doenças cardiovasculares em pacientes com síndrome metabólica (BERNINI et al., 2016).

As bifidobactérias são micro-organismos comensais encontrados principalmente no trato gastrointestinal humano e animal. Algumas características importantes para aplicação de *B. animalis* subsp. *lactis* são que essa cepa apresenta alta resistência em condições simuladas do processo digestivo e boa capacidade de adesão as células epiteliais intestinais. Portanto, para exercer suas funções benéficas essas bactérias precisam aderir à mucosa intestinal e colonizar (WANG et al., 2013). As bifidobactérias apresentam formas diversas, entre essas se destacam o formato curto, hastes curvas e hastes bifurcadas em forma de “Y”. Os parâmetros ótimos para multiplicação, como a temperatura e pH variam respectivamente entre 37 – 41 °C e 6 – 7 (GOMES; MALCATA, 1999). Trabalhos recentes adicionaram *B. animalis* subsp. *lactis* em *frozen* iogurte de leite de cabra, queijo cheddar, barra de cereal salgada e chocolate meio amargo (BEZERRA et al., 2015; BAMPI et al. 2016; DEMERS-MATHIEU et al., 2016; SILVA et al., 2017)

Outros micro-organismos vêm sendo investigados por seus efeitos benéficos, como alguns dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Propionibacterium*, assim como algumas leveduras. Entretanto, ainda existe muita limitação na aplicação dessas bactérias em alimentos, especialmente dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, por questões associadas a segurança. Todavia, uma vantagem da sua utilização seria a capacidade de formação de esporos, o que torna esses micro-organismos menos vulneráveis quando comparados às suas células vegetativas (FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013).

2.2 Alimentos Probióticos

Os benefícios do consumo de alimentos probióticos apenas são alcançados quando esses micro-organismos chegam vivos e em quantidade adequada até o intestino, ou seja, a população bacteriana deve manter sua viabilidade durante a vida de prateleira e na passagem pelo sistema gastrointestinal. A regularidade do consumo de alimentos probióticos também é outro aspecto a ser considerado para o incremento da saúde (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Para garantir a funcionalidade e eficácia do alimento probiótico, é necessário que a contagem de células viáveis gire em torno de 10^6 - 10^8 UFC/g (CHAMPAGNE et al., 2011). A ANVISA recomenda que a quantidade mínima de

probióticos deva estar entre 10^8 - 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC), na recomendação diária do produto que os contenha (ANVISA, 2002).

Por outro lado, o consumo de suplementos probióticos vem ganhando destaque nos últimos anos, sendo comercializados no formato de cápsulas em farmácias. A administração oral desses micro-organismos resulta em uma grande perda da viabilidade, devido à passagem pelo sistema gastrointestinal, sendo injuriados pela elevada acidez do estômago e a presença de sais biliares ao alcançar o intestino (COOK et al., 2012). Quando os probióticos são consumidos dessa forma, se exclui o efeito sinérgico do alimento ocasionando uma redução da funcionalidade. Nesse contexto, os alimentos servem como veículos para a entrega dos probióticos, podendo proteger esses micro-organismos durante o processo digestivo. Entretanto, alguns fatores podem afetar a sobrevivência dos probióticos, como o conteúdo de gordura, tipo e concentração de proteínas, açúcares e pH (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). A funcionalidade dos probióticos pode ser potencializada quando incorporados em alimentos, dependendo dos ingredientes e interações. Os produtos lácteos, em especial, são considerados a melhor matriz alimentícia para veiculação de probióticos devido as suas características físico-químicas (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; VINDEROLA et al., 2011). Entretanto, outros alimentos vêm sendo explorados, como é o caso do chocolate que pode ser uma boa opção para a diversificação desse nicho de mercado.

Atualmente o consumo de alimentos probióticos é impulsionado por efeitos à saúde e promoção de bem-estar, ao invés de tratamentos de sintomas e doenças (FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013). Os alimentos probióticos são requisitados por melhorarem a qualidade de vida. No entanto, esses micro-organismos são susceptíveis ao oxigênio, temperaturas elevadas e variações de pH, sendo desafiadora a diversificação desses produtos com doses adequadas de probióticos para a indústria de alimentos (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Além disso, segundo Tripathi e Giri (2014), os probióticos podem ocasionar algumas alterações sensoriais no alimento devido à produção de componentes metabólicos. Nesse sentido, é uma tendência de mercado à diversificação dos alimentos probióticos oferecidos, sendo que a elaboração de chocolate meio amargo, que já é um produto com boa aceitação por diversas faixas etárias e que apresenta benefícios já conhecidos pela presença dos compostos fenólicos, aliado a adição de probióticos seria uma alternativa promissora aos consumidores.

Dentre os compostos presentes em chocolate, os polifenóis apresentam destaque pelas propriedades biológicas, como a atividade antioxidante, anticarcinogênica e antimicrobiana. A microbiota intestinal apresenta interação bidirecional com os compostos fenólicos afetando a absorção desses, ao mesmo tempo em que os metabólitos polifenólicos influenciam a multiplicação de algumas espécies bacterianas (VALDÉS et al., 2015). Em relação ao efeito antimicrobiano dos compostos fenólicos foi verificado em experimentos *in vitro* que o extrato de semente de uva contendo teor total de fenólicos entre 414 mg/g - 279 mg/g promoveu o crescimento de bactérias benéficas (*Lactobacillus* sp) e diminuiu as contagens de bactérias indesejáveis como *Clostridium histolyticum* (CUEVA et al., 2013). Portanto, os compostos fenólicos podem agir positivamente na multiplicação dos probióticos adicionalmente aos efeitos benéficos já mencionados anteriormente.

Considerando os metabolismos microaerófilo e anaeróbio dos micro-organismos probióticos, e suas respectivas aplicações em alimentos, baixa quantidade de oxigênio presente nas embalagens e processamento é recomendável para evitar a toxicidade e a morte das células viáveis. Nesses micro-organismos ocorre uma redução incompleta do oxigênio para peróxido de oxigênio, pela falta de uma cadeia transportadora de elétrons. Além disso, esses micro-organismos não produzem catalase, que é uma enzima responsável pela quebra do peróxido de oxigênio, acumulando metabólitos tóxicos, o que causa a morte da célula (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Exemplos de alimentos probióticos disponíveis no mercado mundial são exibidos na Figura 2. Alguns segmentos destacam-se como os produtos lácteos, representados pelo sorvete, iogurte, queijo e margarina. Entretanto, devido a algumas dietas com restrições a lactose, outros produtos conquistaram seu espaço no mercado, como é o caso dos sucos de frutas, barras de cereais, creme de avelã, chocolate, assim como o *muffin* de chocolate, que de acordo com as indicações do rótulo é necessário acrescentar água e aquecer o produto por 30s em micro-ondas. No Brasil, apesar da diversidade de frutas, o segmento de alimentos probióticos se restringe aos produtos lácteos, como leite fermentado, iogurte e queijo, devido à conveniência desses processamentos para adição dos probióticos.

As pesquisas mais recentes sobre a aplicação de probióticos em alimentos são apresentadas na Tabela 1. Uma tendência do mercado é conciliar os efeitos benéficos dos compostos fenólicos presentes em alguns alimentos com os probióticos. Dessa forma, a elaboração do sorvete de butiá, além da boa aceitação sensorial, manteve os compostos

bioativos e a viabilidade dos probióticos durante a estocagem (CRUXEN et al., 2017). Outro trabalho que explorou a interação entre compostos fenólicos e probióticos é o de Marinho (2016) que elaborou *sorbets* simbióticos de juçara, atendendo a uma demanda crescente de dieta com restrição calórica e ao leite. Os produtos apresentaram boa aceitabilidade pelo público, além disso, foi verificado que o produto era rico em compostos fenólicos, o que poderia potencializar os efeitos benéficos dos probióticos e prebióticos.

Figura 2 – Exemplos de alimentos e bebidas probióticas comercializadas no mercado mundial. Cada categoria está listada acima da imagem do produto.

Fonte: Própria autoria.

Recentemente a categoria de sucos fermentados e não fermentados vem sendo estudada para a aplicação dos probióticos. Pereira, Maciel e Rodrigues (2011) elaboraram suco de caju e maçã fermentado, obtendo contagens acima de 8 log UFC/mL de células viáveis durante 42 dias de estocagem. Outro trabalho avaliou o suco de laranja para a veiculação de probióticos obtendo contagens de até 6 log UFC/ml de células viáveis durante 28 dias de estocagem. Além disso, o suco de laranja probiótico foi bem aceito e manteve suas características físico-químicas durante o período de armazenamento (COSTA et al., 2017).

Os preparados em pó para refresco apresentam como vantagem a baixa atividade de água, o que pode influenciar na viabilidade dos probióticos durante a estocagem. Nesse sentido, Alves et al. (2016) avaliaram o suco de laranja fermentado em pó durante 3 semanas, e pelo menos 5,5 log UFC/g de células viáveis foram enumeradas no tempo final de estocagem. Por outro lado, foi verificado que o *spray drying* reduziu em média 5 log UFC/g das células viáveis, enquanto o secador de leito de jorro reduziu aproximadamente 0,25 log UFC/g. Essa diferença pode ser explicada devido a temperatura utilizada para secagem em cada processo, para o *spray drying* foi empregada a temperatura de 140 °C, enquanto no leito de jorro 60 °C. Portanto, a temperatura de secagem deve ser a mais baixa possível, de forma a evitar maiores danos às células probióticas.

Trabalhos recentes avaliaram a adição de probióticos em alimentos com baixa atividade de água. Um exemplo é o creme de amendoim que foi acrescentado de probióticos, sendo observado que a matriz alimentícia protegeu-os durante a passagem simulada pelo trato gastrointestinal (KLU; CHEN, 2015). Bampi et al. (2016) elaboraram barras de cereais salgadas adicionados de probióticos microencapsulados, e a viabilidade dos probióticos encapsulados foi de pelo menos 8 log UFC/g durante 90 dias de estocagem. Na elaboração de chocolate ao leite e amargo probiótico por Laličić-Petronijević et al. (2015), as amostras foram estocadas nas temperaturas de 4 °C e 20 °C. A partir dos resultados obtidos foi verificado que o chocolate probiótico não precisa ser armazenado em temperaturas de refrigeração, pois o tratamento mantido a 20 °C não apresentou declínio da população de probióticos, mesmo após 180 dias de estocagem.

Alimentos secos ou com baixa atividade de água acrescentados dos probióticos apresentam como principal vantagem o prolongamento da viabilidade dos micro-organismos. Isso ocorre, porque a matriz alimentícia possibilita que os micro-organismos se mantenham em estado latente. Além disso, Vesterlund, Salminen e Salminen (2012) verificaram que a

viabilidade dos probióticos em alimentos secos é menos dependente da matriz alimentícia a qual os micro-organismos foram adicionados sendo principalmente influenciada pela atividade de água do produto.

Tabela 1 – Aplicações de probióticos em alimentos que foram pesquisadas recentemente.

Alimento ou bebida	Cepa utilizada	Referência
Suco de laranja	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>Paracasei</i> (<i>L. casei</i> -01)	Costa et al. (2017)
Suco de caju e maçã fermentado	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442	Pereira, Maciel e Rodrigues (2011)
Sorvete de butiá (<i>Butia odorata</i>)	<i>Bifidobacterium lactis</i> (Bl-04)	Cruxen et al. (2017)
Sorbet de juçara (<i>E edulis</i>)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3 e <i>Lactobacillus paracasei</i> BGP-1	Marinho (2016)
Suco de laranja fermentado em pó	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442	Alves et al. (2016)
Creme de amendoim	5 espécies de <i>Bifidobacterium</i> e 9 espécies de <i>Lactobacillus</i>	Klu e Chen (2015)
Barra de cereal salgada	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BLC1	Bampi et al. (2016)
Chocolate ao leite e amargo	<i>L. acidophilus</i> NCFM® e <i>B. lactis</i> HN019	Laličić-Petronijević et al. (2015)

Fonte: Própria autoria.

2.3 Encapsulação de Probióticos

Vários fatores determinam a sobrevivência dos micro-organismos probióticos adicionados em alimentos, como às propriedades endógenas da cepa, processamento, características físico-químicas do alimento, como atividade de água, umidade, concentração dos ingredientes, presença de oxigênio, além do processo digestivo (BISPO; GUIMARÃES;

MIRANDA, 2011). Durante o processo digestivo ocorre uma sequência de condições que podem causar injúria às células bacterianas, como o meio ácido do estômago, os sais biliares e enzimas pancreáticas no intestino delgado. Os sais biliares apresentam natureza antimicrobiana, pois dissolvem a membrana do micro-organismo (KLEEREBEZEM; VAUGHAN, 2009). O processo de digestão inicia-se na boca, no entanto, apenas ao atingir o estômago há uma redução considerável da viabilidade dos probióticos. O pH do estômago e tempo em trânsito dependerá do indivíduo, variando de acordo com a idade e o tempo desde que fez sua última refeição. O pH do estômago oscila entre 1 – 2,5, e o tempo de esvaziamento gástrico pode variar de 5 minutos a 2 horas (COOK et al., 2012).

Dessa forma, os benefícios do consumo de probióticos apenas são garantidos quando os mesmos chegam vivos até o intestino, e para tal finalidade são necessárias ações para garantir sua viabilidade durante a vida de prateleira e na passagem pelo sistema gastrointestinal (FÁVARO-TRINDADE, 2011). Para superar alguns dos problemas mencionados, a microencapsulação dos probióticos é proposta, para a proteção dos micro-organismos durante o processo digestivo e estocagem do produto. Essa tecnologia permite o empacotamento do micro-organismo, protegendo-o das condições adversas do meio (VOS et al., 2010).

De acordo com Fávaro-Trindade (2011) apesar de existirem diversas técnicas de encapsulação, nem todas podem ser aplicadas para os probióticos, porque alguns métodos podem utilizar solventes tóxicos aos micro-organismos ou fazer uso de agentes encapsulantes não reconhecido como seguro (GRAS). A tecnologia de encapsulação pode aumentar a sobrevivência do probiótico durante a estocagem do alimento, assim como promover a entrega bem sucedida de probióticos ao trato gastrointestinal. Além disso, é desejável que a adição das microcápsulas probióticas não altere as características sensoriais do alimento, no entanto, o tamanho da partícula poderá afetar a textura (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; FÁVARO-TRINDADE; HEINENEMANN; PEDROSO, 2011).

A encapsulação pode produzir dois tipos básicos de estruturas, sendo que em função da distribuição do recheio recebem nomenclaturas diferentes, como pode ser visualizado na Figura 3. Quando a partícula é mononucleada, ou seja, o recheio é envolvido por uma película de parede, a microcápsula é denominada do tipo “reservatório”, mas se o recheio se distribui ao longo do material, a micropartícula é denominada do tipo “esponja” ou matriz (ALVIM, 2005; ZUIDAM; SHIMONI, 2010).

As propriedades dos agentes encapsulantes determinam os mecanismos de liberação dos probióticos das partículas. Alguns exemplos de mecanismos de liberação são: variação do pH e da temperatura, solubilidade do meio, ruptura mecânica e gradiente de concentração do meio (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Portanto, a matriz de encapsulação ou carreador deve oferecer boa proteção contra o meio ácido melhorando a resistência do probiótico ao processo digestivo. No presente estudo é utilizada a gordura como matriz de encapsulação, dessa forma, o micro-organismo é liberado via aquecimento (temperaturas acima do ponto de fusão), desintegração física (mastigação) ou na digestão (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

Figura 3 – Tipos de estruturas obtidas após o processo de encapsulação.

Fonte: Adaptado de ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, N. Overview of microencapsulates for use in food products of processes and methods to make them. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. A. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**, New York: Springer, 2010. cap.2, p.3-29.

Dois fatores que devem ser considerados para a escolha da tecnologia de encapsulação de probióticos para aplicação em alimentos são o tamanho da microcápsula e a sobrevivência do micro-organismo. Para reduzir a possibilidade de injuriar o micro-organismo é de interesse que durante o processo de encapsulação não sejam empregadas altas temperaturas (COOK et al., 2012). Cinco métodos vêm sendo bastante aplicados para encapsular probióticos: *spray-drying*, *spray-chilling*, *spray-coating*, extrusão e emulsão (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

O encapsulamento por *spray-drying* apresenta algumas vantagens, como a rapidez e baixo custo, e já é utilizado em produtos comerciais. No entanto, alguns fatores de injúria durante esse processo de encapsulação, como o aquecimento, podem causar danos à membrana e inativação do probiótico (PÁEZ et al., 2013). Nesse sentido, outras técnicas de encapsulação vêm ganhando atenção, como *spray chilling* e coacervação complexa, objetos de estudo desse projeto.

Trabalhos recentes de microencapsulação de probióticos estão apresentados na Tabela 2. Como mencionado anteriormente, a escolha do carreador é essencial para determinar os principais gatilhos, ou seja, a liberação dos probióticos em determinadas condições.

Tabela 2 – Estudos recentes sobre encapsulação de probióticos.

Método de Encapsulação	Carreadores	Probióticos	Referência
Emulsificação seguida por recobrimento com células de levedura	Alginate de sódio e células de levedura	<i>L. acidophilus</i> PTCC 1643 e <i>B. bifidum</i> PTCC 1644	Mokhtari, Jafari e Khomeiri (2016)
Coacervação complexa	Isolado proteico do soro de leite, goma arábica e óleo de atum	<i>L. casei</i> 431	Eratte et al. (2015)
<i>Spray drying</i>	Maltodextrina, mucilagem e proteína solúvel das sementes de chia e linhaça	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15679 and <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Bustamante et al. (2017)
Co-extrusão	Alginate de sódio, shellac, gordura de coco e óleo de girassol	<i>L. paracasei</i> BGP-1	Silva et al. (2016)
Emulsificação	Extratos do chá verde, pectina, óleo de canola e cloreto de cálcio	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052	Gaudreau et al. (2016)
<i>Spray chilling</i>	Gordura vegetal, inulina e polidextrose	<i>L. acidophilus</i> LAC-04	Okuro et al. (2013)
<i>Spray chilling</i>	Manteiga de cacau	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-01 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC-04	Pedroso et al. (2013)

Fonte: Própria autoria.

Ao encapsular os probióticos almeja-se que a liberação ocorra apenas no intestino, pois o processo digestivo apresenta condições deletérias para as células, como o pH baixo do estômago e sais biliares. Dessa forma, diversos pesquisadores avaliaram a resistência dos micro-organismos encapsulados em comparação aos livres em fluidos gastrintestinais, simulando o processo digestivo, sendo alguns ensaios *in vitro* (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; PICOT; LACROIX, 2004; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; GBASSI et al., 2009; GEBARA et al., 2013) e outros *in vivo* (MANDAL et al., 2013; PÁEZ et al. 2013). Esses ensaios são fundamentais para verificar se o método de encapsulação empregado e a escolha dos carreadores foram eficientes e protegeram os micro-organismos.

2.3.1 *Spray Chilling*

A encapsulação por *spray chilling* é um processo bastante similar ao *spray drying*, pois ambos atomizam a mistura do carreador e composto bioativo. Entretanto, o que diferencia esses processos é a temperatura do ar utilizado na câmara de atomização, sendo empregado ar quente para o *spray drying* e frio para o *spray chilling*. Os principais carreadores utilizados para a encapsulação por *spray chilling* são as matrizes lipídicas com ponto de fusão entre 32 – 45 °C (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). De acordo com Champagne e Fustier (2007), o uso de termogéis, como a κ -carragena, é uma possibilidade para diversificar os materiais encapsulantes utilizados nesse processo de encapsulação.

Existem muitas controvérsias na literatura ao utilizar os termos *spray-chilling*, *spray-cooling* e *spray-congealing*. Zuidam e Shimon (2010) destacam que a principal diferença entre os termos *spray-chilling* e *spray-cooling* é o ponto de fusão do lipídio utilizado como carreador, dessa forma, se for entre 32 – 42 °C o processo é classificado como *spray-chilling*, caso o ponto de fusão seja maior é classificado como *spray-cooling*. Já o termo *spray-congealing* se refere ao uso de carreadores derretidos independente do ponto de fusão (OKURO; MATOS JR; FÁVARO-TRINDADE, 2013).

O processo de encapsulação por *spray chilling* utiliza como material encapsulante a gordura vegetal previamente fundida. O composto bioativo é adicionado na gordura fundida e homogeneizado mecanicamente. Em seguida, a dispersão (composto bioativo e gordura fundida) é bombeada para o equipamento e atomizada em uma câmara fria, ocorrendo transferência de calor entre o ar frio e a dispersão aquecida (ALBERTINI et al., 2008;

OKURO; MATOS JR; FÁVARO-TRINDADE, 2013), com a formação das partículas pela cristalização do lipídio. Esse método apresenta diversas vantagens, como o baixo custo, a não utilização de solventes, a alta escala produtiva e dependendo do tipo de matriz lipídica utilizada não é necessária a aplicação de temperatura elevada (MATOS JR et al., 2017). A representação esquemática do funcionamento do *spray chiller* pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática do *spray chiller*.

Fonte: Própria autoria.

As micropartículas sólidas lipídicas (MSL) produzidas por esse método podem ser classificadas como matrizes, pois o conteúdo do material bioativo está presente em toda a estrutura, inclusive na superfície. Segundo Gouin (2004), mesmo que o processo não conduza a uma encapsulação “verdadeira”, ou seja, um número significativo do composto bioativo fica na superfície das micropartículas, as propriedades obtidas pelo *spray chilling* são muitas vezes suficientes para liberação gradual do ingrediente. Ademais, a sincronia associada ao fato de que a digestão lipídica ocorre efetivamente no intestino, e os lipídios são os principais carreadores empregados nessa técnica, demonstra o potencial do *spray chilling* para a

encapsulação dos probióticos que serão liberados no intestino, onde atuam benéficamente à saúde do hospedeiro (FÁVARO-TRINDADE; OKURO; MATOS JR, 2015).

Vários compostos bioativos foram encapsulados utilizando essa técnica, como vitamina D₃ (PAUCAR et al., 2016), extrato da canela (TULINI et al., 2016), licopeno (PELLISSARI et al., 2016), ácido ascórbico (MATOS JR et al., 2017), oleoresina de gengibre (ORIANI et al., 2016) e probióticos (OKURO et al., 2013; PEDROSO et al., 2012).

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, a encapsulação de probióticos por *spray chilling* demonstrou bons resultados. Pedroso et al. (2012) encapsularam *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* por *spray chilling*, utilizando gordura vegetal interesterificada como material encapsulante. Em outro estudo, Pedroso et al. (2013) avaliaram a manteiga de cacau como agente encapsulante dos probióticos, utilizando o mesmo método de encapsulação. O processo de encapsulação não reduziu significativamente as células viáveis, porém durante a estocagem houve uma redução da viabilidade dos micro-organismos, portanto, esse é um aspecto a ser melhorado. Okuro et al. (2013) co-encapsularam *L. acidophilus* ou *L. rhamnosus* com inulina ou polidextrose, utilizando gordura como matriz encapsulante pelo mesmo método de *spray chilling*. Todas as combinações avaliadas de probiótico e prebiótico para a produção das micropartículas incrementaram a taxa de sobrevivência do probiótico, quando exposto aos fluidos gastrointestinais simulados, comparado com as células probióticas livres.

No presente estudo, *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* foram encapsulados por *spray chilling*, utilizando gordura vegetal como material encapsulante, assim como Pedroso et al. (2012) e Okuro et al. (2013), apesar de não utilizar os mesmos micro-organismos probióticos e gordura. Devido à alteração da matriz encapsulante e dos probióticos estudados foi necessário caracterizar as micropartículas sólidas lipídicas.

2.3.1 Coacervação Complexa

De acordo com Gouin (2004), a coacervação é uma tecnologia de encapsulação que baseia-se na separação de fases de um ou vários hidrocolóides da solução inicial, e a subsequente deposição da fase coacervada recém-formada ao redor do composto bioativo suspenso ou emulsionado no mesmo meio reacional. Esse processo inicia-se com a suspensão do composto bioativo no material de núcleo, podendo utilizar um dos polímeros (proteína), ou

pode ser preparada uma emulsão. Logo após, é adicionado o outro polímero (polissacarídeo), sendo que o pH é ajustado com a finalidade dos coloides apresentem cargas opostas. A temperatura do sistema é reduzida, para que o material de recobrimento solidifique-se, e conseqüentemente ocorra a separação de fase. Dependendo da aplicação das microcápsulas, são empregados alguns métodos de secagem, como o *spray drying* e a liofilização (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005).

O tamanho da microcápsula e suas características são influenciadas pela variação de pH, concentração iônica e razão entre matriz e componente bioativo (VOS et al., 2010). Além disso, a coacervação complexa produz cápsulas verdadeiras, ou seja, o composto bioativo é todo recoberto por um material de parede, dessa maneira é adequado aplicar esse método de encapsulação quando o objetivo é controlar a liberação do agente (SANTOS et al., 2015).

Alguns dos materiais encapsulantes mais utilizados na coacervação complexa são a gelatina e a goma arábica (ALVIM; GROSSO, 2010). Quando esses materiais são aplicados como encapsulantes, o pH é ajustado abaixo do ponto isoelétrico da gelatina, o que a torna carregada positivamente e a goma arábica continua carregada negativamente (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). A goma arábica, também conhecida como goma acácia, é um exsudado obtido de árvores de acácia. Esse material é heterogêneo e consiste de duas frações primárias. Uma dessas frações apresenta uma cadeia de polissacarídeos com pouca ou nenhuma proteína, representando 70% da goma. A outra fração apresenta moléculas de maior massa molecular com proteínas em sua estrutura. Entre suas propriedades, destacam-se a fácil dissolução em água e a capacidade emulsificante (BEMILLER; HUBER, 2010). Por outro lado, a gelatina é obtida pela hidrólise parcial do colágeno, a principal proteína presente na pele e ossos de animais. Os principais constituintes da gelatina são moléculas grandes e complexas de polipeptídeos. Em meios ácidos, a gelatina apresenta carga positiva, enquanto em meios alcalinos apresenta carga negativa, e essa propriedade é fundamental para a microencapsulação por coacervação. Além disso, sua aplicação é baseada nas suas propriedades de transição gel-sólido da solução aquosa, a viscosidade em soluções aquecidas e de formar recobrimentos firmes e flexíveis interessantes para a indústria (KEENAN, 1997).

Alguns trabalhos já verificaram a aplicação da coacervação complexa para encapsulação de probióticos. Oliveira et al. (2007a) avaliaram a coacervação complexa seguida de atomização para encapsulação de probióticos, utilizando o conjugado pectina e caseína. Os micro-organismos encapsulados foram mais resistentes em condições ácidas

comparado com as culturas na forma livre. Em outro trabalho de Oliveira et al. (2007b), apesar de terem utilizado a mesma técnica de encapsulação para os probióticos, a secagem das microcápsulas foi realizada em leito fluidizado, sendo que os resultados foram diferentes em relação a proteção dos micro-organismos encapsulados quando expostos às condições de pH ácido simulando o estômago. Esses resultados podem ter diferido devido ao método de secagem das microcápsulas, ou seja, a eficácia do método de encapsulação é influenciada pelo processo de secagem. Eratte et al. (2015) co-encapsularam probióticos e óleo de atum utilizando isolado proteico do soro de leite e goma arábica. A viabilidade dos probióticos foi maior quando co-encapsulado com óleo de atum comparando com a encapsulação dos probióticos apenas com as matrizes poliméricas. Portanto, a utilização de lipídios, em especial no estado sólido, para dispersão dos probióticos seguido pelo recobrimento das matrizes poliméricas pode proteger os micro-organismos por ser uma barreira adicional.

Considerando esses resultados significativos foram elaboradas partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros (PLRIEP), seguido pela secagem por liofilização, com a finalidade de verificar durante a estocagem a viabilidade dos micro-organismos estudados, e avaliar a taxa de sobrevivência ao ensaio *in vitro* da exposição aos fluidos gastrointestinais simulados.

2.4 Chocolate Probiótico

Chocolate é uma suspensão de partículas, composta principalmente de açúcar e cacau, envolvidas pela matriz lipídica da manteiga de cacau. Portanto, a manteiga de cacau representa a fase contínua do chocolate, sendo a matriz dispersante para as partículas sólidas do cacau, açúcar e outros ingredientes (LOPES, 2015). Além disso, a manteiga de cacau é responsável pela dureza e quebra a temperatura ambiente (*snap*), completa fusão na boca, brilho, desprendimento de aroma e sabor (QUAST et al., 2007).

Uma das principais propriedades que faz o chocolate muito agradável aos consumidores é a sua habilidade de derreter na boca, apesar de ser um produto sólido durante o armazenamento (LUCCAS; BONOMI; KIECKBUSCH, 2014). A preparação do chocolate envolve algumas etapas que podem causar efeitos danosos à viabilidade do probiótico. Assim, a incorporação dos probióticos em chocolate é realizada após a etapa de temperagem, para evitar qualquer efeito nocivo às células bacterianas. A estocagem do chocolate é outro ponto

crítico, desde que o chocolate meio amargo é estocado em temperatura ambiente por até seis meses, dependendo do tipo de embalagem e processamento, o que pode resultar em perda da viabilidade do probiótico no produto.

O chocolate é um produto obtido a partir de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.) com outros ingredientes, apresentando no mínimo 25% (g/100g) de sólidos totais de cacau (ANVISA, 2005). O chocolate meio amargo é caracterizado por apresentar teor de cacau entre 35 – 50%. A porção diária recomendada para o consumo do chocolate é bastante debatida na literatura. Giuseppe et al. (2008) sugeriram que o consumo regular de aproximadamente 20 g de chocolate amargo pode trazer benefícios a saúde. Diversos efeitos benéficos estão associados ao consumo de chocolate, como a diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares pelos mecanismos de redução da pressão sanguínea, dessa forma, melhorando a função endotelial, a sensibilidade à insulina e os marcadores inflamatórios. (BUIJSSE et al., 2010). As substâncias biologicamente ativas presentes no chocolate, tais como os polifenóis, que são responsáveis por esses efeitos (NEBESNY et al., 2007). Entretanto, Gültekin-Özgüven, Berktaş e Özçelik (2016) verificaram que o teor de fenólicos é reduzido durante algumas etapas de fabricação do chocolate, como a torrefação dos grãos de cacau.

As operações necessárias para o processamento do chocolate podem ser visualizadas na Figura 5. A etapa de refino é realizada para reduzir e controlar o tamanho das partículas da mistura do líquido de cacau e açúcar, que não devem ser maiores que 30 µm. Essa operação permite que o chocolate apresente propriedades de escoamento desejáveis, além disso, evita que o produto final apresente partículas perceptíveis ao paladar do consumidor. A conchagem é outra etapa essencial para o desenvolvimento do aroma e sabor do produto, removendo os compostos que ocasionam amargor e retraindo os desejáveis. Nessa etapa, a massa do chocolate é mantida sob aquecimento por um longo período, dependendo do tipo de chocolate produzido. A conchagem apresenta três estágios, a primeira fase é classificada como fase seca, onde ocorre a remoção do sabor ácido e da umidade. Na segunda fase, o chocolate está em forma de pasta, requisitando mais energia para manter o processo de conchagem. Por último, são adicionadas a manteiga de cacau e os emulsificantes, sendo necessário o aumento da velocidade de mistura para a homogeneização (BECKETT, 2009). No presente trabalho, foi sugerida a adição dos probióticos na etapa final de temperagem, para evitar o stress térmico do processo de conchagem (65 °C por 16h) que inviabilizaria o desenvolvimento do produto.

Figura 5 – Fluxograma proposto para o processamento do chocolate probiótico.

Fonte: Própria autoria.

O processamento do chocolate deve ser bem controlado, pois a manteiga de cacau é uma gordura polimórfica, isso é, cristaliza em diferentes formas. Nesse sentido, a etapa de temperagem é a mais crítica para elaboração dos produtos sugeridos, pois é a que mais influencia nas propriedades físicas e sensoriais do produto. A Figura 6 apresenta a curva de temperagem do chocolate. A temperagem tem por objetivo induzir a cristalização de forma controlada para a manteiga de cacau alcançar sua forma cristalina mais estável, conhecida como forma β , sendo que se inicia com a completa fusão da fase gordurosa do chocolate, em temperaturas próximas a 40 °C. Em sequência realiza-se um resfriamento controlado na taxa de 2 °C/min, até uma temperatura de aproximadamente 28 °C, sob agitação, para induzir a cristalização da gordura (TALBOT, 2009). Chocolates mal temperados estão associados ao defeito chamado *fat bloom*, que pode ser definido como a migração da fração líquida da gordura que será recristalizada na superfícies ocasionando manchas esbranquiçadas no

produto e consequentemente a rejeição do consumidor e prejuízos consideráveis na comercialização (COHEN; LUCCAS; JACKIX, 2004; DEYPERE et al., 2009).

Figura 6 – Curva de temperagem do chocolate.

Fonte: Adaptado de TALBOT, G. Chocolate Temper. In: BECKETT, S.T. (Ed.) **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. New York: Wiley-Blackwell, 2009, p. 261-275.

No contexto da elaboração de chocolates probióticos, destacam-se os trabalhos de Lahtinen et al. (2007) e Possemier et al. (2010) que demonstraram que a matriz lipídica da manteiga de cacau protege o micro-organismo probiótico. Os resultados sugeriram que a matriz lipídica possivelmente bloqueia as células bacterianas da exposição à água e de íons H^+ . Maillard e Landuyt (2008) incorporaram microcápsulas probióticas em chocolate, sendo que a viabilidade dos probióticos no intestino delgado foi três vezes maior comparado à incorporação em matriz láctea. Portanto, por meio desses estudos foi verificada a possibilidade da diversificação das matrizes alimentícias para adição dos probióticos. Foong et al. (2013) desenvolveram chocolate probiótico, adicionado de *Lactobacillus plantarum* isolado de grãos de cacau fermentados, e obtiveram baixa taxa de sobrevivência. Dessa forma, a tecnologia de encapsulação poderia ser uma alternativa para melhorar a viabilidade da bactéria isolada. Mandal et al. (2013) elaboraram chocolate ao leite simbiótico, utilizando *Lactobacillus casei* e inulina, verificou-se que a encapsulação em alginato de sódio comparado com a forma livre, não incrementou a viabilidade dos probióticos durante a estocagem do produto.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi produzir e caracterizar amostras de chocolate meio amargo contendo probióticos na forma livre ou encapsulada durante a estocagem a 25 °C por 120 dias.

3.2 Objetivos específicos

- Encapsular *L. acidophilus* LA3 e *B. animalis* subsp. *lactis* BLC1 por *spray chilling* e em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros;
- Caracterizar as micropartículas sólidas lipídicas probióticas, quanto à morfologia, tamanho e a_w ;
- Verificar se os métodos de encapsulação estudados protegeram os micro-organismos em diversas condições de stress;
- Produzir amostras de chocolate meio amargo contendo probióticos na forma livre ou encapsulada, com a finalidade de verificar os efeitos da encapsulação e da matriz alimentícia na viabilidade dos micro-organismos;
- Avaliar as características físico-químicas do chocolate probiótico, como pH, a_w , teor total de fenólicos e gordura, índice de brancura (IB) e dureza;
- Avaliar a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento das amostras de chocolate por 120 dias à temperatura de 25 °C;
- Analisar a resistência dos probióticos adicionados ao chocolate em soluções que simulam os fluídos gástrico e intestinal;
- Analisar a aceitação e intenção de compra das amostras de chocolate meio amargo probiótico.

4 Material e Métodos

4.1 Materiais

Foram utilizadas cepas comerciais de *Lactobacillus acidophilus* (LA3) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BLC1), gentilmente cedidas pela Sacco Brasil, Campinas. A gordura vegetal *low trans* (com ponto de fusão de 48 °C) foi doada pela empresa Triângulo Alimentos (Itápolis, Brasil). Os polímeros gelatina suína (pI 4,5) e goma arábica foram adquiridos da Gelita South America (Mococa, Brasil) e Nexira (São Paulo, Brasil), respectivamente.

4.2 Tratamentos

As micropartículas contendo probióticos foram produzidas por *spray chilling* (SC) ou recobertas por interação eletrostática (RIE), e os tratamentos estão apresentados na Tabela 3. As concentrações de probióticos adicionadas nos carreadores foram previamente determinadas para a obtenção de micropartículas com contagens entre 8 – 7 log UFC/g.

Tabela 3 – Tratamentos das micropartículas produzidas por spray chilling ou recobertas por interação eletrostática.

Tratamentos	Probiótico	Gordura	Gelatina	Goma arábica
LA – SC	<i>L. acidophilus</i> LA3 (4% m/m)	96% m/m	-	-
LA – RIE	<i>L. acidophilus</i> LA3 (7,5% m/m)	37,5% m/m	27, 5% m/v	27, 5% m/v
BLC – SC	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BLC1 (4% m/m)	96% m/m	-	-
BLC – RIE	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BLC1(7,5% m/m)	37,5% m/m	27, 5% m/v	27, 5% m/v

Fonte: Própria autoria.

Selecionada a técnica de encapsulação foram produzidas amostras de chocolate meio amargo adicionadas dos micro-organismos na forma livre e encapsulada. A Tabela 4 apresenta as formulações de chocolate meio amargo probiótico, sendo que as concentrações de probióticos livres ou microencapsulados foram determinadas previamente para a obtenção de produtos com contagens entre $8 - 7 \log$ UFC/g.

Tabela 4 – Formulação das amostras de chocolate meio amargo probiótico.

Amostras	Probiótico	Livre	Encapsulado por <i>spray chilling</i>
1	Controle (sem probiótico)	-	-
2	<i>L. acidophilus</i> LA3 (1% m/m)	X	-
3	<i>L. acidophilus</i> LA3 (10% m/m)	-	X
4	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BLC1 (1% m/m)	X	-
5	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BLC1 (10% m/m)	-	X

Fonte: Própria autoria.

4.3 Métodos

4.3.1 Produção e caracterização das micropartículas probióticas

4.3.1.1 Preparo dos inóculos probióticos

As cepas liofilizadas de *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* foram reativadas em 10 mL de caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) (Acumedia, Indaiatuba, Brasil), incubadas em Biochemical Oxygen Demand – BOD (Tecnal TE 391, Piracicaba/SP, Brasil) a 37 ± 1 °C

por 18 h. Foi transferido 10 mL do cultivo para 90 mL de caldo MRS, completando-se 100 mL, e o frasco com o cultivo foi incubado a 37 ± 1 °C por 18 h. Em seguida o material foi centrifugado a 7000 rpm por 5 minutos à 5 °C, e lavado duas vezes com citrato de sódio 2%, sendo ressuspensão em 10 mL de citrato de sódio 2% e adicionado em um frasco com 500 mL de caldo MRS sendo incubado novamente a 37 ± 1 °C por 18 h. Nessa última etapa o cultivo foi centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente, e lavados duas vezes com citrato de sódio 2%, sendo ressuspensão em citrato de sódio 2% para obtenção de uma suspensão bacteriana com contagem final de $10^9 - 10^{10}$ UFC/mL. Na Figura 7 pode ser visualizado o esquema da metodologia utilizada para o preparo do inóculo.

Figura 7 – Representação esquemática do cultivo das células bacterianas para obtenção do inóculo.

Fonte: Própria autoria.

4.3.1.2 Enumeração dos micro-organismos probióticos

Para as diluições seriadas dos micro-organismos livres ou encapsulados padronizou-se o uso de citrato de sódio 2% aquecido à temperatura de 50 °C, para ocorrer a completa fusão do material de parede possibilitando a liberação total dos micro-organismos (GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004; PEDROSO et al., 2012; OKURO et al., 2013).

Para a enumeração foi utilizado o método da gota, *drop plate*, em ágar MRS (Acumedia, Indaiatuba, Brasil). Foram realizados testes preliminares, e verificada a formação de colônias dos probióticos estudados, quando empregado o método da gota para plaqueamento. Além disso, a escolha desse método possibilitou a economia de material e tempo para análise. Uma placa com ágar MRS foi dividida em 6 partes, sendo pipetado em cada parte o volume de 20 µL para cada diluição previamente obtida. As placas inoculadas

foram acondicionadas em jarros de anaerobiose contendo um gerador de anaerobiose (Probac do Brasil – São Paulo/SP, Brasil), e incubadas a temperatura de 37 ± 1 °C por 48 h. As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

4.3.1.3 Curva de padronização dos inóculos

A curva de padronização do inóculo foi elaborada seguindo a metodologia de Begot et al. (1996), correlacionando as medidas de absorvância com contagens em placas de ágar MRS. Uma das vantagens da curva de padronização é a rapidez da estimativa da concentração bacteriana obtida pela medida da absorvância, enquanto a enumeração em placas exige um período de incubação de aproximadamente 48 h, o que tornaria o processo dispendioso quando é necessária a imediata aplicação do inóculo, seja em um alimento ou na preparação das micropartículas. As bactérias foram cultivadas como descrito no item 4.3.1.1. O inóculo foi submetido a algumas diluições, sendo realizadas as medidas de absorvância. A enumeração em placas de ágar MRS foi realizada como detalhado no item 4.3.1.2.

4.3.1.4 Perfil de hidrofobicidade da parede celular dos probióticos

A adesão bacteriana na mucosa intestinal depende de uma série de fatores, dentre eles a hidrofobicidade da parede celular do micro-organismo. O método proposto por Rosenberg (1980), conhecido como MATH – *Microbial Adherence To Hydrocarbons* permite verificar a hidrofobicidade bacteriana por meio da aderência aos hidrocarbonetos. Para essa análise foi utilizada a metodologia proposta por Adami (2013).

Os probióticos foram cultivados como anteriormente mencionado no item 4.3.1.1. O cultivo bacteriano foi centrifugado a 7000 rpm por 5 min a 10 °C, sendo lavado duas vezes com solução tampão de KOH (50 mM, pH 7,0) para neutralização elétrica das células bacterianas. As células foram ressuspensas em solução de KNO₃ (0,1 mM, pH 6,2).

Foi adicionado 4 mL da suspensão bacteriana aos tubos, sendo acrescentado 1 mL dos solventes, entre eles o clorofórmio, xilol e acetato de etila. Os tubos foram colocados em repouso por 5 minutos, em seguida foram agitados utilizando um agitador de tubos na velocidade máxima por 2 minutos permitindo o contato entre a suspensão bacteriana e o

solvente, novamente os tubos ficaram sob repouso pelo período de 1 h para a separação de fases.

Para verificar a porcentagem de adesão das células probióticas aos solventes foi utilizado um espectrofotômetro para leitura a 600 nm da fase aquosa da suspensão preparada anteriormente. O cálculo utilizado para determinação da hidrofobicidade está apresentado na Equação (1).

$$\text{Hidrofobicidade (\%)} = \frac{(DO_A - DO_B)}{DO_B} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:

$$\begin{array}{l} DO_A \left\{ \begin{array}{l} \text{Branco} - 5 \text{ mL de KNO}_3 \\ \text{Amostra} - 5 \text{ mL de KNO}_3 + \text{células} \end{array} \right. \\ \\ DO_B \left\{ \begin{array}{l} \text{Branco} - 4 \text{ mL de KNO}_3 + 1 \text{ mL de solvente} \\ \text{Amostra} - 4 \text{ mL de suspensão bacteriana em KNO}_3 + 1 \text{ mL de solvente} \end{array} \right. \end{array}$$

4.3.1.5 Microencapsulação dos probióticos por *spray chilling*

As micropartículas sólidas lipídicas (MSL) probióticas foram produzidas de acordo com Okuro et al. (2013), com algumas modificações. Foi utilizado um banho-maria (Marconi – MA 184, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 58 °C para fundir a gordura vegetal. O inóculo (4% m/m) foi cultivado e preparado, conforme descrito respectivamente nos itens 4.3.1.1 e 4.3.1.3, e misturado à gordura fundida, sendo homogeneizado com o auxílio de Ultra-Turrax (Ika, Alemanha) a 7000 rpm por 1 min. A mistura foi transportada por uma bomba peristáltica Masterflex – model 77201-62 (Illinois, Estados Unidos) à uma vazão de 60 mL/min e foi atomizada em um spray chiller (Labmaq, Ribeirão Preto/SP, Brasil) através de um atomizador duplo fluido (diâmetro de 1,2 mm) em câmara resfriada com corrente de ar à temperatura de 15 ± 2 °C, com pressão de ar de 5 bar. As MSL foram armazenadas em frascos de vidro a 25 °C e -18 °C, para posterior caracterização das amostras.

4.3.1.6 Microencapsulação dos probióticos em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros

As micropartículas lipídicas recobertas por interação eletrostática foram obtidas de acordo com a metodologia descrita por Comunian et al. (2013), com algumas modificações. O micro-organismo foi cultivado e padronizado como detalhado nos itens 4.3.1.1 e 4.3.1.3, respectivamente. Em seguida, o inóculo foi centrifugado para remover o citrato de sódio 2%, e aproximadamente 1 g massa celular do probiótico foi adicionada a 5 g de gordura vegetal previamente fundida a 58°C e homogeneizada em Ultra-Turrax (Ika, Alemanha) a 3500 rpm por 1 min. Em seguida, a mistura foi adicionada de 150 mL de solução de gelatina (2,5% m/v) sendo homogeneizado à 7000 rpm por 90 s, e sequencialmente foi adicionado 150 mL da solução de goma arábica (2,5 % m/v), sendo que a mistura foi mantida por agitação magnética na temperatura de aproximadamente 50 °C. A Figura 8 ilustra a metodologia para obtenção das microcápsulas coacervadas.

Figura 8 – Metodologia utilizada para produção das micropartículas lipídicas recobertas por coacervados.

Fonte: Própria autoria.

Sob agitação magnética e aquecimento, o pH foi ajustado para 4,5, que foi determinado em testes preliminares onde se avaliou a faixa de pH 3,0 – 4,5. Ao alcançar esse pH, o béquer foi removido do aquecimento e resfriado até aproximadamente 10 °C. As micropartículas foram mantidas sob refrigeração por 12 horas para decantação. Com o auxílio

de um dispensador foi removida a água, sendo que as micropartículas foram congeladas em freezer e posteriormente secas em um liofilizador LC - 1500 (Terroni, São Carlos, Brasil).

4.3.1.7 Tamanho e distribuição das micropartículas

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das micropartículas produzidas foram determinados em analisador de partículas por difração de raio laser Shimadzu Sald – 201V (Kyoto, Japão). As amostras produzidas por *spray chilling* foram dispersas em etanol absoluto e estabilizadas por 5 minutos, enquanto que as partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática foram dispersas em água destilada.

4.3.1.8 Caracterização morfológica por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a avaliação da morfologia das micropartículas foi utilizado um microscópio óptico (BEL Photonics – Milão, Itália) equipado com câmera e software BEL View v.62. Foi também utilizado um microscópio eletrônico de varredura Tabletop Microscope Hitachi TM 300 (Tóquio, Japão), e para tal, as MSL foram fixadas em uma fita de carbono dupla face (Ted Pella, Inc. – Redding, EUA) que foi adicionada em uma base de alumínio. As imagens foram capturadas na voltagem de 15 kV.

4.3.1.9 Avaliação da sobrevivência dos micro-organismos aos processos de encapsulação

Para a avaliação da resistência dos micro-organismos ao processo de *spray chilling*, as células viáveis foram enumeradas antes do processo de encapsulação, na dispersão, que seria a mistura homogeneizada do inóculo com a gordura previamente fundida, e depois, nas micropartículas, as quais foram previamente fundidas em solução aquecida de citrato de sódio 2% e enumeradas em placas de ágar MRS como relatado no item 4.3.1.2.

Em relação à encapsulação dos probióticos em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática, foi verificado se ocorreu perda das células bacterianas para o meio durante o processo de decantação das partículas, para tal uma alíquota da água decantada foi removida para análise microbiológica. Além disso, os probióticos encapsulados também foram enumerados antes e após o processo de liofilização para verificar se a contagem do

número de células viáveis foi reduzida, já que as amostras foram congeladas previamente e secas por 48 h.

4.3.1.10 Avaliação da viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem

Foram realizadas contagens dos micro-organismos encapsulados, durante o período de estocagem das micropartículas na temperatura de -18 °C e 25 °C, nos tempos: 0, 30, 60, 90 e 120 dias. A enumeração foi realizada como descrito no item 4.3.1.2.

4.3.1.11 Avaliação da resistência dos probióticos encapsulados sob diferentes condições de stress: pH, NaCl, sacarose e temperatura

O efeito do pH foi avaliado seguindo a metodologia proposta por Fávaro-Trindade e Grosso (2002), com algumas modificações. Soluções de citrato de sódio 2% foram acidificadas com HCl, para os valores de pH 2, 4,5 e 7. Assim, aproximadamente 1 g das micropartículas lipídicas foram adicionadas em 9 mL de solução acidificada, e como controle foi utilizado o inóculo. A resistência dos probióticos foi avaliada por enumeração, como descrito no item 4.3.1.2, no tempo inicial e após 3 h incubado a 37 °C.

Os efeitos do sal e sacarose foram analisados de acordo com Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014). Soluções de citrato de sódio 2% foram adicionadas de NaCl nas concentrações de 3%, 6% e 9%, enquanto a sacarose foi adicionada em diferentes concentrações de 10%, 25% e 45%. Alíquotas foram coletadas para cada tratamento, no tempo inicial e após 3 h. A taxa de sobrevivência foi avaliada por enumeração em ágar MRS.

O efeito da temperatura também foi verificado, considerando que as partículas serão adicionadas na massa de chocolate aquecida. Dessa maneira, as partículas probióticas foram adicionadas em tubos contendo citrato de sódio 2%, sendo adicionados em banho-maria a 50 °C. Os probióticos encapsulados foram enumerados após 0, 30 e 60 min.

4.3.1.12 Avaliação *in vitro* da sobrevivência dos probióticos livres e encapsulados aos fluidos gastrointestinais simulados

Para elaboração do fluido gástrico simulado (FGS) foi utilizado 9 g/L de NaCl e 3 g/L de pepsina, ajustando o pH para 1,8 com HCl (2 M). Para o fluido intestinal simulado (FIS)

foi adicionado a mesma quantidade de NaCl, 3 g/L de sais biliares, 10 g/L de pancreatina e 10 g/L de tripsina, e o pH da solução foi ajustado para 6,5 com NaOH (0,2 M).

Para a simulação *in vitro* da passagem pelo trato gastrointestinal das micropartículas probióticas e dos micro-organismos livres, foi utilizada a metodologia descrita por Gbassi et al. (2009). Para tal, foi adicionado 0,5 g das micropartículas, ou 0,5 mL do inóculo, em 4,5 mL do fluido gástrico simulado (FGS). Após 120 minutos, o material remanescente foi adicionado de 5 mL do fluido intestinal simulado (FIS). Foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 60, 120, 210 e 300 min para contagem por plaqueamento. A Figura 9 apresenta uma representação esquemática da análise *in vitro*.

Em relação aos ajustes de pH dos fluidos, o pH do FGS foi ajustado previamente para $1,8 \pm 0,1$, com ácido clorídrico (2 M), antes da adição das micropartículas. Entretanto, o ajuste do pH do FIS para $6,5 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (0,2 M), foi realizado após o material remanescente da etapa que simula o FGS, foi adicionado ao FIS. Durante todo o ensaio, as amostras ficaram incubadas em um shaker aquecido a 37 °C e sob agitação orbital a 100 rpm, representando uma situação análoga à passagem pelo trato gastrointestinal humano.

Figura 9 – Representação esquemática da avaliação *in vitro* da sobrevivência dos probióticos aos fluidos gastrointestinais.

Fonte: Própria autoria.

4.3.2 Produção do chocolate meio amargo probiótico

4.3.2.1 Preparação dos inóculos probióticos para aplicação em chocolate

Os probióticos foram cultivados e padronizados como descrito nos itens 4.3.1.1 e 4.3.1.3, respectivamente. O inóculo foi ajustado para contagem de células viáveis de 10^{10} UFC/mL, posteriormente foi removido o citrato de sódio 2%, e apenas a massa celular dos probióticos (1% m/m) foi adicionada ao chocolate meio amargo para não afetar a qualidade do produto final, por se tratar de uma matriz lipídica.

4.3.2.2 Produção do chocolate meio amargo

Para a elaboração do chocolate meio amargo foi utilizada a formulação sugerida por Grunennvaldt (2009): 47% (m/m) de açúcar (União, Sertãozinho, Brasil), 43% (m/m) de líquido de cacau (Barry Callebaut Brasil S.A., Ilhéus, Brasil), 10% (m/m) de manteiga de cacau (Barry Callebaut Brasil S.A., Ilhéus, Brasil), 0,3% (m/m) de lecitina de soja (Bunge Alimentos S.A., São Paulo, Brasil) e 0,2% (m/m) de polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) (Danisco, Cotia, Brasil).

O chocolate meio amargo foi elaborado na planta piloto do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL – Campinas, Brasil). Inicialmente as matérias primas foram pesadas, considerando a formulação citada. O líquido de cacau foi aquecido e adicionado ao açúcar, sendo homogeneizado em um misturador encamisado (INCO, Alemanha) a 40 °C. Em seguida, a mistura foi refinada utilizando um moinho (Draiswerk GMBH GMBH, Alemanha) constituído de três cilindros horizontais resfriados internamente com água. Logo após, a conchagem foi executada em um misturador encamisado (INCA, Alemanha) a 65 °C por 16 h. Faltando 2 h para finalizar o processo, a manteiga de cacau foi adicionada. Restando 1 h para a finalização da conchagem foram adicionados os emulsificantes lecitina de soja e polirricinoleato de poliglicerol (PGPR). A temperagem foi realizada manualmente com auxílio de espátulas em sala climatizada.

Os probióticos livres foram preparados como descrito no item 4.3.2.1 e adicionados (1 % m/m) na massa após o processo de temperagem. Para os tratamentos contendo os probióticos encapsulados foi adicionado aproximadamente 10 g de MSL para cada 100 g de chocolate, considerando que a contagem inicial dos probióticos encapsulados era aproximadamente 10^8 - 10^9 UFC/g. Em seguida, o chocolate pré-cristalizado foi adicionado

em moldes de polietileno, sendo colocados em mesa vibratória com a finalidade de evitar a formação de bolhas no produto final. Os moldes com o produto foram colocados em um túnel de resfriamento a 10 °C por 30 min. O chocolate foi desmoldado manualmente, embalado em papel chumbo, sendo mantido a 20 °C por 15 dias para a estabilização da rede cristalina. Após esse período, as amostras foram mantidas na temperatura de 25 °C.

A Figura 10 apresenta o fluxograma de processamento do chocolate meio amargo, destacando as etapas mencionadas anteriormente.

Figura 10 – Fluxograma do processamento de chocolate probiótico.

Fonte: Própria autoria.

4.3.2.3 Avaliação do diâmetro das partículas durante o refino

Durante o processo de refino foram coletadas amostras para verificar o diâmetro das partículas, que é desejável em torno de 20 – 25 μm , sendo utilizada a metodologia proposta por Luccas e Kieckbusch (2006). Esse controle foi fundamental para evitar que o produto final apresentasse uma sensação de arenosidade ao paladar. Para tal, as amostras foram dispersas em óleo mineral, sendo mensurado o diâmetro com micrômetro digital (Mitutoyo, Japan). Se o tamanho das partículas estivesse fora da faixa ideal era necessário o ajuste da faca e posição dos cilindros.

4.3.2.4 Índice de temperagem

Após a temperagem manual do chocolate foi verificado o índice de temperagem ou grau de cristalização, para avaliar se a temperagem foi bem sucedida. Para tal, foi utilizado o temperíndex (Sollich, Alemanha), que fornece a curva de solidificação do chocolate e o índice de temperagem. A avaliação do processo, se o chocolate foi bem temperado ou não, dependerá do formato da curva e do índice de temperagem obtidos. Durante a análise, se o índice de temperagem apresentasse valores fora da faixa de 4 – 6, o processo era refeito, pois demonstrava que o chocolate foi mal temperado.

4.3.3 Caracterização do chocolate meio amargo probiótico

No presente estudo foi avaliado o potencial do chocolate meio amargo como uma nova matriz para incorporação de probióticos. *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 foram escolhidos para serem aplicados nesse alimento, porque são cepas comerciais, ou seja, foram previamente estudados quanto a segurança e benefícios. Além disso, esses micro-organismos apresentam diferentes metabolismos, já que *L. acidophilus* é microaerófilo enquanto *B. animalis* subsp. *lactis* é anaeróbio, o que é interessante para investigar e comparar suas aplicações em chocolate. As amostras de chocolate foram caracterizadas como descrito abaixo.

Os parâmetros avaliados nas amostras de chocolate foram: atividade de água (a_w), pH, índice de brancura (IB), dureza e microscopia eletrônica de varredura da superfície.

4.3.3.1 Atividade de água e pH das amostras de chocolate

Os tabletes de chocolate foram cortados em porções menores para avaliação da atividade de água (a_w) das amostras, sendo medida com o auxílio de um equipamento Aqualab (Decagon Devices, EUA). Os valores obtidos foram expressos entre zero a um. Para medir o pH do chocolate foi pesado 10 g da amostra, cortada em pequenos pedaços, e adicionada de 100 mL de água deionizada. A mistura foi mantida sob agitação pelo período de 20 minutos, em seguida sendo registrado o pH da amostra com o auxílio de um potenciômetro. Essas análises foram realizadas mensalmente por um período de estocagem de 120 dias.

4.3.3.2 Determinação do teor total de gordura e fenólicos das amostras de chocolate

Inicialmente, 1g da amostra de chocolate foi desengordurada utilizando 10 mL de n-hexano, e a mistura foi homogeneizada usando vórtex e colocada em ultrassom por 5 min, em seguida a mistura foi centrifugada (5000 rpm por 5 min). Esse procedimento foi realizado duas vezes, como descrito por Adamson et al. (1999) e Alañón et al. (2016). Em seguida, as amostras foram secas para eliminar o n-hexano residual. A extração dos fenólicos foi realizada duas vezes para garantir a máxima liberação dos compostos, dessa forma, 1 g da amostra de chocolate desengordurada foi adicionada em 10 mL de solução alcóolica (80% v/v) e homogeneizada usando ultrassom durante 10 min, sendo em seguida, centrifugada a 5000 rpm por 5 min.

O teor de fenólicos total foi determinado de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) e Souza et al. (2014). Assim, 0,25 mL do extrato de chocolate foi adicionado a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin–Ciocalteu. Após 3 min, foi adicionada a mistura aproximadamente 0,25 mL de carbonato de sódio saturado (Na_2CO_3), sendo homogeneizado usando vórtex. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 30 min para completar a reação. O espectrofotômetro (Hach DR 2800, USA) foi utilizado para medir a absorbância a 750 nm. O teor total de fenólicos foi determinado usando ácido gálico como referência (Apêndice A), e os resultados foram expressos como mg de Ácido Gálico Equivalente (AGE)/g de chocolate.

O teor de gordura foi determinado usando o método de Bligh e Dyer (1959), o qual consiste em extrair os lipídios com clorofórmio, metanol e água nas proporções de 1 : 2 : 0,8, respectivamente. A quantidade de lipídios presente nas amostras foi determinada removendo uma alíquota de 5 mL de extrato de clorofórmio, seguido por evaporação do solvente em

estufa a 100 °C por 40 min aproximadamente. O béquer foi resfriado em um dessecador, e em seguida pesado.

4.3.3.3 Cor superficial e dureza das amostras de chocolate

Foi avaliada a coloração das amostras de chocolate com o auxílio de um colorímetro (HunterLab Model MiniScan XE, Reston, USA), sendo possível correlacionar essa análise com o desenvolvimento de *fat bloom*. Os parâmetros “L”, “a” e “b” foram medidos, e o índice de brancura (IB) foi calculado a partir da Eq. (2) descrita por Lohman e Hartel (1994):

$$IB = 100 - [(100 - L)^2 + a^2 + b^2]^{0.5} \quad \text{Eq. (2)}$$

Quanto maior o valor do IB mais branca é a superfície do chocolate, essa análise foi realizada no primeiro dia de estocagem e após 120 dias.

Para verificar a dureza dos produtos foi realizado o teste de perfuração das amostras de chocolate com um texturômetro (TA XT Plus Texture Analyser, Extralab, Brasil), utilizando a probe *needle* P/2, como descrito por Afoakwa et al. (2008). Foram utilizadas amostras com formato 40 mm x 25 mm x 7 mm (comprimento x largura x espessura). Para essa análise foram padronizadas as velocidades de *prespeed* 1 mm/s, *test* 2 mm/s, *postspeed* 10 mm/s e penetração de 5 mm. Essa análise também foi realizada no tempo inicial e após 120 dias de estocagem.

4.3.3.4 Morfologia da superfície das amostras de chocolate utilizando microscopia eletrônica de varredura

As superfícies das amostras de chocolate foram analisadas com um microscópio eletrônico de varredura, utilizando a metodologia de Luccas et al. (2014) e Afoakwa et al. (2009). Essa análise foi realizada no tempo inicial e após 120 dias de estocagem, com o intuito de verificar a formação de cristais de gordura na superfície das amostras.

4.3.4 Análises microbiológicas das amostras de chocolate

4.3.4.1 Qualidade microbiológica das amostras de chocolate

As enumerações de coliformes termotolerantes e a detecção de *Salmonella* spp. foram realizadas de acordo com os métodos relatados na literatura (ANDREWS et al. 2001;

KORNACKI; JOHNSON, 2001). Essas análises foram realizadas no primeiro dia de estocagem, antecipadamente à análise sensorial para garantir a segurança dos provadores.

Foram utilizadas placas Petrifilm™ para contagem de coliformes (3M Microbiology, EUA). Dessa forma, 10 g da amostra de chocolate foram adicionadas em 90 mL de água peptonada 0,1%, seguido por mais duas diluições seriadas decimais, obtendo ao final diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Foi removido 1 mL dessas diluições sendo inoculadas nas placas Petrifilm™ CC sendo incubadas a 45 °C por 24 h – 26h. Para a leitura dos resultados, os coliformes são indicados nas placas pela presença de colônias vermelhas com bolhas de gás.

A determinação da presença-ausência de *Salmonella* foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Para tal, 25 g de chocolate meio amargo foram adicionados em 225 mL de água peptonada tamponada, sendo incubado a 35 °C por 24 h. Aproximadamente 0,1 mL dessa mistura foram adicionadas em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, em seguida sendo incubada a 43 °C por 24 h. Além disso, 1 mL da mesma mistura foi adicionada em 10 mL de caldo Tetrathionato sendo acrescidos dos reagentes lugol e verde brilhante a 37 °C por 24 h. Os caldos foram inoculados em placas de ágar sulfito de bismuto, ágar entérico de Hectoen e ágar Rambach, e incubados a 35 °C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* foram semeadas em ágar tríplice açúcar ferro e incubadas (36 °C, 24-30 h). Indicativos da presença de *Salmonella* são os isolados com ápices de tonalidades róseos ou avermelhados e base preta, que para a confirmação é necessário aplicar testes de sorologia com antissoro polivalente O.

4.3.4.2 Viabilidade dos probióticos em amostras de chocolate durante a estocagem a 25 °C

A viabilidade dos probióticos pode ser afetada durante a estocagem dos produtos, assim a enumeração desses micro-organismos é essencial durante o armazenamento que foi realizado a 25 °C. Aproximadamente 5 g de cada amostra de chocolate foram diluídas em 45 mL de citrato de sódio 2% previamente aquecido a 50 °C. Após a homogeneização por 2 min em saco plástico estéril, alíquotas de 1 mL foi removida, diluída serialmente e inoculada em ágar MRS. Em seguida, as placas inoculadas foram incubadas por 48 h a 37 °C, e as colônias individuais foram enumeradas. Os resultados foram expressos como UFC/g de chocolate. Essa análise foi realizada mensalmente por 120 dias.

4.3.4.3 Sobrevivência dos probióticos livres e encapsulados em chocolate quando adicionados aos fluidos gastrointestinais simulados

Para a análise da simulação *in vitro* da passagem pelo trato gastrointestinal foi utilizada a mesma metodologia descrito previamente no item 4.3.1.12. Para isso, 5 g do chocolate probiótico foi adicionado em 45 mL do fluido gástrico simulado, que apresentava em sua composição 9 g/L de NaCl, 3 g/L de pepsina, com o pH ajustado para 1,8 utilizando HCl (2 M). Após 120 minutos, a mistura contendo a amostra de chocolate e o FGS foi adicionada de 50 mL de FIS, ao final apresentando as concentrações de 9 g/L de NaCl, 10 g/L de pancreatina, 10 g/L de tripsina e 3 g/L de sais biliares, e o pH ajustado para 6,5, utilizando NaOH. O ensaio apresentou 5 h de execução, sendo utilizada uma incubadora aquecida a 37 °C com movimento orbital a 100 rpm, para simular a temperatura corpórea e os movimentos peristálticos. Foram removidas alíquotas a cada 60 minutos, para enumeração da população bacteriana.

4.3.4.4 Análise sensorial das amostras de chocolate

O projeto de nº 35269214.0.0000.5422 foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (ANEXO I). A análise sensorial das amostras de chocolate meio amargo probiótico foi realizada de acordo com Meilgaard, Civille e Carr (1999), após 20 dias de estocagem.

Essa análise foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), que é equipado de cabines individuais e luz fluorescente. Inicialmente todos os provadores assinaram duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B). Em seguida, foi entregue um questionário sobre o perfil de consumo dos provadores (APÊNDICE C), para verificar a frequência do consumo e as preferências de chocolate. Os atributos avaliados pelos 100 provadores não treinados foram: aroma, cor, sabor, textura e aceitação global (APÊNDICE D). As amostras foram apresentadas monadicamente em copos descartáveis codificados com três dígitos numéricos randomizados. Os provadores foram instruídos a enxaguar o paladar a cada amostra, para evitar equívocos durante a avaliação. A escala hedônica de 9 pontos foi utilizada, sendo “1” referente a “desgostei extremamente” e “9” como “gostei extremamente”. Além disso, os provadores foram questionados em relação à intenção de compra, apresentando como opções: “sim, eu compraria”, “talvez eu compraria”

e “não, eu não compraria”. A intenção de compra verifica o potencial de venda do produto desenvolvido no mercado.

4.3.5 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes, e os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Tukey (95% de intervalo de confiança), usando o programa SAS v. 9.1.3 (Statistic Analysis Software, SAS Institute Inc., USA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

5 Resultados e Discussão

5.1 Curva de padronização do inóculo

As curvas de padronização dos inóculos podem ser visualizadas na Figura 11, onde são correlacionadas as medidas de absorvância com contagens em placas de ágar MRS. Essas curvas permitem a padronização do inóculo para a encapsulação, assim como para a aplicação em chocolate meio amargo.

Figura 11 – Curva de padronização dos inóculos de *L. acidophilus* (LA3) e *B. animalis* subsp. *lactis* (BLC1).

Fonte: Própria autoria.

As aplicações dos inóculos exigem que a determinação da concentração de probióticos seja rápida, nesse contexto, o plaqueamento seria um processo dispendioso e inviável. Com as equações obtidas, as concentrações bacterianas em suspensão salina de citrato de sódio 2% foram estimadas de maneira prática, comparada ao método de plaqueamento, onde é necessário que as placas fiquem incubadas por períodos de até 48h.

Os coeficientes de correlação das curvas obtidas apresentaram valores próximos a um, o que demonstra a boa correlação a partir das equações potenciais escolhidas para os valores experimentais.

5.2 Perfil de hidrofobicidade da parede celular dos probióticos

A adesão das bactérias na mucosa intestinal depende das adesinas, que são estruturas adesivas presentes na superfície dos micro-organismos, e dos receptores, que são estruturas complementares presentes nas células hospedeiras. A adesão bacteriana é influenciada inicialmente pelas interações reversíveis, que são regidas pelas cargas e hidrofobicidade. As cargas líquidas de ambos são negativas, o que cria forças repulsivas, porém, essas forças repulsivas podem ser superadas pelas forças atrativas entre as moléculas hidrofóbicas presentes em números variáveis em ambas as superfícies (BEACHEY, 1981).

O perfil de hidrofobicidade da parede celular dos probióticos estudados está ilustrado na Figura 12. Os solventes utilizados apresentam características diferentes entre si, e dependendo da migração das células para uma fase ou outra permite identificar se o micro-organismo apresenta parede celular hidrofóbica (xilol), ácida (clorofórmio) ou básica (acetato de etila). Dessa forma, os probióticos também poderiam migrar para a fase aquosa ou para a fase contendo o hidrocarboneto.

Figura 12 – Adesão da parede celular dos probióticos estudados, LA3 – *L. acidophilus* e BLC1 – *B. animalis* subsp. *lactis*, em diferentes solventes, expressos como porcentagem (%).

Fonte: Própria autoria.

L. acidophilus (LA3) apresentou uma parede celular mais hidrofóbica e ácida, com adesão em xilol de 58% e em clorofórmio de 97%, quando comparado com *B. animalis* subsp. *lactis* (BLC1) que apresentou 27% de adesão em xilol e 68% de adesão em clorofórmio.

Portanto, os resultados demonstram que a capacidade de adesão de ambos os micro-organismos na mucosa é favorecida pelas interações em pH ácido. Além disso, como ambas as bactérias apresentaram perfil hidrofóbico, pela adesão em xilol, esses micro-organismos têm potencial de aderência no epitélio intestinal. Outros trabalhos verificaram que a capacidade de adesão do probiótico na mucosa intestinal é maior quando o micro-organismo apresenta parede celular mais hidrofóbica e ácida (PELLETIER et al., 1997; BARBOSA; BARBOSA, NICOLI, 2011).

Resultados similares foram observados por Pelletier et al. (1997) que avaliaram o perfil de hidrofobicidade de cepas de *Lactobacillus* spp. O perfil ácido foi verificado em todas as cepas, sendo determinado por meio da adesão em clorofórmio, assim como foi observado no presente trabalho. Entretanto, resultados diferentes foram encontrados em relação ao perfil hidrofílico das cepas estudadas, sendo relevante mencionar que a cepa *L. acidophilus* LA3 não foi investigada naquele estudo. Outra diferença do trabalho de Pelletier et al. (1997) em relação ao presente estudo foi o uso do hexadecano como solvente não polar, enquanto no presente trabalho utilizou-se o xilol.

O potencial de adesão dos probióticos em conjunto com os prebióticos foi avaliada por Adami (2013), que utilizou como prebióticos, galactooligossacarídeos e frutooligossacarídeos, e como probióticos, *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (La-05). A fermentação dos substratos prebióticos aumentou a acidez do meio e consequentemente o perfil hidrofóbico e ácido da membrana. Dessa forma, os probióticos associados aos prebióticos incrementou a aderência das células microbianas a mucosa intestinal. Portanto, a veiculação dos probióticos em alguns alimentos, dependendo da sua composição, também pode potencializar a adesão dos probióticos.

5.3 Caracterização das micropartículas probióticas

Os pós obtidos por *spray chilling* e por recobrimento por interação eletrostática seguido por liofilização, podem ser visualizados na Figura 13. Observa-se que para os dois métodos de encapsulação foram obtidos pós finos com coloração esbranquiçada, além da presença de aglomerados. Como já esperado, a aparência dos pós foi à mesma independente do micro-organismo utilizado.

Figura 13 – Imagem dos pós obtidos por (1) *spray chilling* e (2) por recobrimento por interação eletrostática seguido de liofilização.

Fonte: Própria autoria.

5.3.1 Atividade de água

A atividade de água (a_w) é um parâmetro importante para a sobrevivência dos probióticos e os resultados são expressos entre valores de 0 a 1. A a_w pode afetar a viabilidade do probiótico encapsulado, uma vez que os micro-organismos podem permanecer metabolicamente ativos em altos valores de a_w , ou em estado latente em baixos valores de a_w (VESTERLUND; SALMINEN; SALMINEN, 2012). Dessa forma, a a_w dos pós produzidos no presente estudo foi avaliada após o processo de encapsulação e acompanhada mensalmente durante a estocagem a 25 °C, e pode ser visualizada na Tabela 5.

Os pós não foram armazenados sob vácuo ou em condições de umidade controlada, com o intuito de simular condições reais, objetivando a futura aplicação em chocolate meio amargo. Dessa forma, todas as amostras absorveram umidade da atmosfera que as envolvia, como pode ser visualizado na Tabela 5, ou seja, todos os pós apresentaram um ligeiro aumento nos valores de a_w durante o armazenamento. Além disso, os pós produzidos por *spray chilling* apresentaram atividade de água na faixa de 0,911 – 0,989, sendo que esses valores são elevados quando comparados com os pós liofilizados que apresentaram atividade de água na faixa de 0,245 – 0,338. Essa variação ocorreu principalmente devido ao processo de liofilização, empregado logo após a produção das micropartículas coacervadas. Os pós produzidos por *spray chilling* apresentaram atividade de água superior pelo fato da adição do

inóculo (mistura de células bacterianas e citrato de sódio 2%) diretamente na gordura o que impactou nesse parâmetro.

Tabela 5 – Atividade de água (a_w) dos pós obtidos por recobrimento por interação eletrostática seguido por liofilização (RIE) ou produzidos por *spray chilling* (SC), logo após a produção e durante o armazenamento (dias) à 25 °C.

Estocagem (dias)	LA-SC	LA-RIE	BLC-SC	BLC-RIE
0	0,911±0,011 ^{Ba}	0,245±0,013 ^{Bb}	0,927±0,002 ^{Da}	0,282±0,014 ^{Cb}
30	0,927±0,010 ^{Ba}	0,268±0,010 ^{Bb}	0,949±0,006 ^{Ca}	0,289±0,013 ^{BCb}
60	0,963±0,006 ^{Aa}	0,307±0,008 ^{Ab}	0,972±0,004 ^{Ba}	0,309±0,004 ^{ABCb}
90	0,974±0,006 ^{Aa}	0,326±0,003 ^{Ab}	0,984±0,003 ^{BAa}	0,320±0,003 ^{BAb}
120	0,983±0,003 ^{Aa}	0,338±0,003 ^{Ab}	0,989±0,002 ^{Aa}	0,332±0,003 ^{Ab}

Médias de atividade de água seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna, e seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Tratamentos: **LA-SC** – pós contendo *L. acidophilus* e produzidos por *spray chilling*, **LA-RIE** – pós contendo *L. acidophilus* e recobertos por interação eletrostática, **BLC-SC** – pós contendo *B. animalis* subsp. *lactis* e produzidos por *spray chilling*, **BLC-RIE** – pós contendo *B. animalis* subsp. *lactis* e recobertos por interação eletrostática. Fonte: Própria autoria.

Valores similares foram determinados por Okuro (2013) que encapsulou probióticos por *spray chilling*, entretanto nesse mesmo estudo foi investigada a aplicação de prebióticos, produzindo MSL simbióticas, ou seja, acrescidas de probióticos e prebióticos. Nesse caso, a atividade de água obtida foi mais baixa, na faixa de 0,882 – 0,905, sendo uma proposta para a redução da atividade de água das MSL produzidas por *spray chilling*. Bampi et al. (2016) encapsularam probióticos por *spray chilling*, aplicando diretamente os micro-organismos liofilizados a gordura aquecida, dessa forma as MSL probióticas obtidas apresentaram a_w abaixo de 0,6.

No presente trabalho as micropartículas probióticas apresentaram a_w elevada, o que interferiu diretamente na viabilidade dos probióticos encapsulados. Dessa forma, houve uma redução de aproximadamente 4 log UFC/g das células viáveis após 60 dias de armazenamento a 25 °C. Por outro lado, as contagens das populações dos probióticos encapsulados mantidos a -18 °C reduziram aproximadamente 2 log UFC/g; esses resultados demonstraram que o congelamento impediu que os micro-organismos se mantivessem ativos, entretanto, não é a condição ideal de estocagem considerando o custo da cadeia do frio e a aplicação das micropartículas probióticas em chocolate, que é um alimento estocado à temperatura ambiente. Mais detalhes sobre a viabilidade dos probióticos encapsulados durante a estocagem será discutido no item 5.3.5.

Segundo Jiménez et al. (2015) a estabilidade dos probióticos é bastante influenciada pelas características de sorção de umidade do produto. Em seu estudo as partículas de alginato foram secas em leito fluidizado, sendo que a sobrevivência dos probióticos foi de 70% quando as cápsulas apresentavam a_w na faixa de 0,436 – 0,536 durante o armazenamento. Portanto, apesar do trabalho mencionado não ter aplicado a mesma técnica de encapsulação e matriz encapsulante, a atividade de água é um fator importante para justificar a viabilidade das células probióticas. Outros estudos também avaliaram os efeitos dos métodos de secagem sobre os probióticos encapsulados, sendo que em baixa a_w os micro-organismos mantiveram-se viáveis permanecendo em baixo estado metabólico durante o período de armazenamento (PODDAR et al., 2014;. ALBADLAN et al., 2015; SILVA et al., 2016).

O potencial de aplicação de micropartículas em alimentos foi investigada por Bampi et al. (2016) que encapsularam probióticos por *spray chilling*, obtendo MSL probióticas que foram acrescentadas satisfatoriamente em barras de cereais. Além disso, a viabilidade dos probióticos foi alta durante a estocagem de 120 dias do produto. Assim, as micropartículas estudadas apresentam potencial para aplicação em alimentos sólidos e não lácteos, tais como o chocolate meio amargo ou amargo e barra de cereal, oferecendo uma alternativa para quem não consome produtos lácteos. Esses produtos também contribuem para manter a baixa atividade de água das micropartículas, desempenhando assim um papel na manutenção da viabilidade dos probióticos encapsulados, como discutido anteriormente.

5.3.2 Caracterização morfológica das micropartículas probióticas

A microscopia óptica das micropartículas coacervadas pode ser observada na Figura 14. É possível verificar o formato esférico, com contornos bem definidos e multinucleados, isso evidencia que o processo de encapsulação foi eficiente. Uma vantagem dessas estruturas do tipo reservatório é que os micro-organismos estão imobilizados na gordura solidificada, que foi recoberta por gelatina, por meio de uma emulsão simples, que está interagindo com a goma arábica. Ou seja, além da imobilização, teoricamente esta partícula tem ainda duas paredes. Essa análise foi realizada logo após a produção das micropartículas, portanto, esse formato não representa a estrutura reidratada.

Figura 14 – Microscopia óptica das micropartículas recobertas por interação eletrostática, (1) com uma lente de aumento de 40X e (2) com uma lente de aumento de 100X.

Fonte: Própria autoria.

As imagens captadas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) das micropartículas recobertas por interação eletrostática e desidratadas estão ilustradas na Figura 15. Esse formato também pode ser verificado em outros trabalhos que utilizaram a goma arábica e gelatina para encapsular compostos bioativos. Pela imagem pode observar que as micropartículas são reticuladas por pontes sólidas, devido ao processo de liofilização que as agrupa (COMUNIAN et al. 2013; ROCHA-SELMÍ et al., 2013; SANTOS et al., 2015).

Na Figura 16 é apresentado o aspecto morfológico das MSL produzidas por *spray chilling* pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). As MSL apresentaram formato esférico, com diâmetros variáveis, superfície predominantemente lisa, além disso, foi verificado que o material estava aglomerado. Alguns poros podem ser visualizados principalmente na Figura 16(4), provavelmente devido à adição do inóculo (suspensão aquosa) diretamente na gordura fundida sem a utilização de emulsificante. Micropartículas probióticas similares foram produzidas por Pedroso et al. (2012), que utilizaram como carreador outro tipo de gordura, a gordura de palma interesterificada. Além disso, os autores observaram que quanto maior a porção aquosa na emulsão, as micropartículas apresentavam a superfície mais rugosa.

Figura 15 – Micrografias das micropartículas desidratadas produzidas por interação eletrostática, sendo (1) e (2) carregadas com *L. acidophilus*, (3) e (4) de *B. animalis* subsp. *lactis*.

Fonte: Própria autoria.

Segundo Albertini et al. (2008) a variabilidade de tamanho é característico de produtos atomizados. Okuro et al. (2013) e Pedroso et al. (2012) obtiveram MSLs probióticas com morfologia bastante semelhante, mesmo utilizando outro tipo de gordura vegetal. O principal inconveniente das micropartículas obtidas por *spray chilling* é que são do tipo matriz, ou seja, os micro-organismos ficam dispersos por toda estrutura, podendo estar na superfície e consequentemente susceptíveis às condições adversas do meio.

Figura 16 – Micrografias das MSL carregadas com *L. acidophilus* (1 e 2, com aumento de 500x e 1.0kx, respectivamente) e *B. animalis* subsp. *lactis* (3 e 4 com aumento de 500x).

Fonte: Própria autoria.

5.3.3 Tamanho médio e distribuição de tamanho das micropartículas probióticas

A determinação do diâmetro das micropartículas é essencial para selecionar sua aplicação em alimentos, porque esse parâmetro pode causar alterações sensoriais no produto, o que não é desejável especialmente se a textura do alimento for um atributo diferenciado para o consumidor. Portanto, os tamanhos médios das micropartículas probióticas estão apresentados na Tabela 6. Segundo Heurtault et al. (2003), vários fatores podem influenciar o tamanho das partículas obtidas, como a composição do lipídio utilizado, o composto que será encapsulado, a proporção dos materiais e os parâmetros de processo (temperatura e velocidade do ar de resfriamento).

Tabela 6 – Médias dos tamanhos (μm) das partículas probióticas obtidas por *spray chilling* ou recobertas por interação eletrostática (RIE).

Probióticos	Métodos de Encapsulação	
	<i>Spray Chilling</i>	RIE
<i>L. acidophilus</i>	79,27 $\pm$ 4,15 μm	83,76 $\pm$ 1,93 μm
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	81,40 $\pm$ 2,21 μm	82,91 $\pm$ 4,31 μm

Valores nas linhas e colunas não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

Os diâmetros das micropartículas variaram entre 79,27 – 83,76 μm , não sendo significativamente diferentes entre si, apesar das diferentes cepas e métodos de encapsulação aplicados. Resultados similares foram determinados por Okuro et al. (2013), apesar da gordura aplicada como matriz encapsulante desse trabalho não ser a mesma. Outro fato a se considerar é que foi utilizado o mesmo *spray chiller*, e conseqüentemente o mesmo bico atomizador.

A distribuição do tamanho das micropartículas probióticas está representada na Figura 17. As MSL obtidas por *spray chilling* apresentaram tamanho entre 40 – 140 μm . De acordo com Albertini et al. (2008), a encapsulação por *spray chilling* produz micropartículas com considerável variação de tamanho entre 50 – 600 μm , o que de fato foi observado nos resultados obtidos no presente estudo. Resultados similares foram determinados por Tulini et al. (2016) que encapsularam extrato de canela por *spray chilling* utilizando o mesmo tipo de gordura vegetal, assim os tamanhos das partículas variaram entre 60 – 130 μm . Entretanto, tamanhos menores foram determinados por Pedroso et al. (2012) que produziram MSL probióticas pela mesma técnica, provavelmente devido ao uso de um atomizador com diâmetro menor ($\varnothing = 0,7 \text{ mm}$), e além disso, foi utilizada gordura interesterificada de palma e amêndoa de palma.

O tamanho das partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática liofilizadas variou entre 60 – 140 μm , como ilustrado na Figura 17. Ambas as micropartículas produzidas, seja por *spray chilling* ou por recobrimento por interação eletrostática, apresentaram uma faixa de variação de tamanho bastante semelhante. Como mencionado anteriormente, a textura do alimento pode ser modificada dependendo do tamanho das microcápsulas aplicadas, dessa forma, as duas micropartículas apresentam potencial para aplicação em alimentos. Resultados similares foram observados por Santos et al. (2015), que avaliaram o tamanho de microcápsulas de xilitol obtidas por coacervação complexa utilizando gelatina e

goma arábica, os valores variaram entre 78,45 – 109,31 μm . Rocha-Selmi et al. (2013) verificaram que o tamanho das microcápsulas de aspartame produzidas por dupla emulsão seguido por coacervação complexa variaram entre 84 – 102 μm . Além disso, foi observado que a concentração dos materiais de parede pode influenciar no tamanho final da microcápsula, quanto maior a concentração dos polímeros usados para produção das microcápsulas, o tamanho final foi ligeiramente menor.

Figura 17 – Distribuição do tamanho das micropartículas contendo probióticos.

Cada linha representa um tratamento diferente, designados como: LA-SC – micropartículas contendo *L. acidophilus* produzidas por *spray chilling*, LA-RIE – micropartículas contendo *L. acidophilus* recobertas por interação eletrostática, BLC-SC – micropartículas contendo *B. animalis* subsp. *lactis* produzidas por *spray chilling*, BLC-RIE – micropartículas contendo *B. animalis* subsp. *lactis* recobertas por interação eletrostática. Fonte: Própria autoria.

5.3.4 Avaliação da sobrevivência dos micro-organismos ao processo de encapsulação

Os resultados da resistência dos probióticos aos processos de encapsulação estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. Para a encapsulação por *spray chilling*, os probióticos foram enumerados no inóculo, na dispersão de gordura vegetal previamente fundida com os micro-organismos, e também após a atomização da dispersão. Essas condições deletérias, como o stress térmico devido ao contato com a gordura aquecida a 58 °C e o stress mecânico pela homogeneização utilizando Ultra-Turrax, ocasionaram a redução das contagens das populações de probióticos em aproximadamente 1 log UFC/g. Porém, já era esperada uma

redução das contagens das populações dos probióticos, pois ocorreu uma diluição do inóculo em gordura vegetal. Por outro lado, a atomização e o processo de resfriamento, concomitantemente realizados pelo *spray chiller*, não reduziram a viabilidade dos probióticos estudados, como pode ser visualizado na Tabela 7, comparando a enumeração do probiótico na dispersão e após o processo de encapsulação. Portanto, a redução de 1 log UFC/g das células viáveis em todo o processo é um resultado bastante positivo, considerando a baixa resistência das células probióticas em diversas condições. Dessa forma, a encapsulação dos probióticos por *spray chilling* é bastante promissora, por não afetar consideravelmente a viabilidade das células. Okuro et al. (2013) investigaram a mesma técnica para encapsulação de probióticos, e observaram que a principal perda de viabilidade dos micro-organismos ocorria devido a exposição a gordura aquecida e também ao processo de homogeneização. Nesse contexto, essa tecnologia de encapsulação apresenta pouco efeito danoso sobre a integralidade das células.

Tabela 7 – Enumeração das células viáveis durante a encapsulação por *spray chilling*, expressos em log UFC/g.

Probióticos	Inóculo	Dispersão	MSL
<i>L. acidophilus</i>	10,20±0,18 ^{Ab}	8,91±0,48 ^{Ba}	8,34±0,61 ^{Ba}
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	10,78±0,24 ^{Aa}	9,13±0,68 ^{Ba}	9,02±0,66 ^{Ba}

Dispersão refere-se à mistura da gordura fundida e as células bacterianas. Valores com a mesma letra maiúscula na mesma linha, e valores com a mesma letra minúscula na mesma coluna não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Fonte: Própria autoria.

A redução da viabilidade dos probióticos também foi avaliada durante a elaboração das partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática, e os resultados estão apresentados na Tabela 8. Na água sobrenadante do processo de encapsulação foi enumerada aproximadamente 3 log UFC/g das populações dos probióticos. Portanto, essa etapa deve ser investigada em futuros trabalhos para evitar a perda dos micro-organismos no processo. Uma opção seria separar as microcápsulas por centrifugação ao invés da decantação, esse processo reduziria o tempo de contato das micropartículas com a água.

Probióticos encapsulados foram considerados resistentes ao processo de liofilização, pois a viabilidade dos micro-organismos não foi reduzida e manteve aproximadamente 96% das células viáveis. Resultados similares foram observados por Shoji et al. (2013) que aplicaram a coacervação complexa para produção de microcápsulas probióticas, mas utilizando o conjugado caseína e pectina, seguido pela secagem em liofilizador. Nessa etapa

de secagem, as contagens das populações de probióticos reduziram aproximadamente 0,7 log UFC/g, demonstrando que a liofilização é um processo brando para os probióticos estudados.

De maneira geral, a produção das micropartículas recobertas por interação eletrostática se mostrou bastante eficiente na sobrevivência dos micro-organismos, considerando que os probióticos foram colocados em algumas condições de injúrias, como o stress térmico ao adicionar a massa celular na gordura fundida e o stress mecânico na homogeneização. Para a liofilização das micropartículas foi necessário congelar as amostras previamente, o que também poderia acarretar alguma perda na viabilidade, mas esse processo não reduziu nenhum ciclo logarítmico das populações probióticas estudadas.

Tabela 8 – Enumeração das células viáveis durante a encapsulação dos probióticos em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE), expressos em log UFC/g.

Probióticos	Água decantada	PLRIE	Após liofilização
<i>L. acidophilus</i>	2,97±0,53 ^{Ba}	7,91±0,41 ^{Aa}	7,57±1,14 ^{Aa}
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2,89±0,56 ^{Ba}	7,82±0,53 ^{Aa}	7,73±1,74 ^{Aa}

Valores com a mesma letra maiúscula na mesma linha, e valores com a mesma letra minúscula na mesma coluna não são estatisticamente diferentes, pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Fonte: Própria autoria.

5.3.5 Avaliação da viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem

As melhores condições para armazenamento das micropartículas probióticas já foram previamente avaliadas no grupo de pesquisa por Pedroso (2012) e Okuro (2013). Entretanto, no presente trabalho foi avaliada a estocagem das micropartículas produzidas nas condições de -18 °C e 25 °C, sem o uso de atmosfera modificada ou vácuo. Essa escolha permitiu simular as condições reais de estocagem de diversos alimentos, pois as micropartículas foram produzidas com essa finalidade de aplicação.

A Tabela 9 apresenta a viabilidade dos micro-organismos encapsulados pelos dois métodos de encapsulação estudados e armazenados à -18 °C. Apesar da baixa temperatura de estocagem, em todos os tratamentos os probióticos encapsulados apresentaram redução da viabilidade durante a armazenagem. Considerando a encapsulação por *spray chilling* para *L. acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, as células viáveis reduziram aproximadamente 4,5 e 6 log UFC/g, respectivamente, enquanto que os mesmos micro-

organismos em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática (PLRIE) reduziram 3 e 3,2 log UFC/g. Possivelmente o declínio da população de probióticos encapsulados por *spray chilling* pode estar relacionado com a estrutura das micropartículas, onde os micro-organismos estão dispersos inclusive na superfície e o contato com o oxigênio pode ocasionar a morte das células. Entretanto, até o período de 60 dias de estocagem todos probióticos encapsulados apresentaram contagens superiores a 5,7 log UFC/g.

Sousa et al. (2015) verificaram o efeito negativo do congelamento na viabilidade dos probióticos encapsulados em alginato, devido as alterações físicas das micropartículas durante a estocagem. Os autores sugeriram a utilização de crioprotetores ou outros polímeros em conjunto com o alginato, para evitar possíveis alterações na estrutura que afetariam diretamente a viabilidade dos probióticos.

Tabela 9 – Viabilidade dos micro-organismos encapsulados por *spray chilling* (SC) e em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE) durante a estocagem à -18 °C por 120 dias. Os valores estão expressos em log UFC/g.

Estocagem (dias)	Tratamentos			
	LA-SC	LA-RIE	BLC-SC	BLC-RIE
0	8,50±0,08 ^{Aa}	7,59±0,19 ^{Ab}	8,94±0,09 ^{Aa}	7,87±0,10 ^{Ab}
30	7,59±0,27 ^{Bab}	6,92±0,12 ^{Abc}	8,11±0,15 ^{Ba}	6,84±0,08 ^{Bc}
60	6,67±0,23 ^{Cab}	5,71±0,25 ^{Bc}	6,99±0,19 ^{Ca}	6,16±0,06 ^{BCbc}
90	5,40±0,25 ^{Da}	5,14±0,19 ^{BCa}	4,84±0,23 ^{Da}	5,62±0,18 ^{Ca}
120	4,05±0,07 ^{Eab}	4,55±0,35 ^{Ca}	3,10±0,14 ^{Eb}	4,65±0,39 ^{Da}

Médias de viabilidade seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna, ou seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Tratamentos: **LA-SC** – micropartículas contendo *L. acidophilus* e produzidas por *spray chilling*, **LA-RIE** – micropartículas contendo *L. acidophilus* e recobertas por interação eletrostática, **BLC-SC** – micropartículas contendo *B. animalis* subsp. *lactis* e produzidas por *spray chilling*, **BLC-RIE** – micropartículas contendo *B. animalis* subsp. *lactis* e recobertas por interação eletrostática. Fonte: Própria autoria.

Nos trabalhos de Okuro et al. (2013) e Pedroso et al. (2012), que também encapsularam probióticos por *spray chilling* e avaliaram a viabilidade dos micro-organismos em diversas condições de estocagem, para o armazenamento a -18 °C os resultados obtidos foram bastante similares aos determinados no presente estudo. As células viáveis foram reduzidas entre 4 - 2 log UFC/g ao final do período de estocagem. De acordo com Pedroso et al. (2012), as MSL probióticas, quando armazenadas em baixas temperaturas, permitem que o

micro-organismo fique no estado latente, além disso, previne os rearranjo de cristais na matriz lipídica, evitando a expulsão do componente bioativo.

A encapsulação de probióticos por coacervação complexa foi investigada por Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014), utilizando como materiais encapsulantes o isolado protéico do soro e goma arábica. Após 60 dias de estocagem a 4 °C, foi observado que as populações reduziram aproximadamente 1,5 log UFC/g das células viáveis. Os autores não detalharam se as amostras foram armazenadas em condições controladas de umidade e oxigênio. Em comparação ao presente trabalho, apesar do uso de outros materiais encapsulantes e a temperatura de estocagem ter sido inferior (-18 °C), a população dos probióticos encapsulados reduziu aproximadamente 1,7 log UFC/g das células viáveis, após 60 dias de estocagem. Em outro trabalho, Shoji et al. (2013) encapsularam probióticos por coacervação complexa utilizando o conjugado caseína e pectina. Os pós liofilizados foram mantidos sob vácuo, e após 120 dias de armazenamento a 7 °C foi observado a redução de aproximadamente 3 log UFC/g das células viáveis. Esses resultados foram similares ao presente trabalho, porém, era esperado que na temperatura de -18 °C a população de probióticos se mantivesse viável por um período maior. Entretanto, os pós liofilizados obtidos no presente estudo não foram armazenados em condições controladas, o que provavelmente influenciou na redução da viabilidade dos probióticos encapsulados.

A Tabela 10 apresenta a viabilidade dos probióticos encapsulados durante a estocagem a 25 °C por 120 dias. No período final de estocagem, 120 dias, a população bacteriana de todos os tratamentos estava abaixo do limite de detecção do método que é 2,7 log UFC/g. Esses resultados diferem da viabilidade dos probióticos encapsulados e estocados a -18 °C, porque naquela condição a água livre das micropartículas estava provavelmente em forma de cristais de gelo diminuindo o metabolismo bacteriano. Valores acima de 6 log UFC/g, que é a contagem mínima recomendada para alimentos probióticos na hora do consumo, foram observados até 30 dias de estocagem a 25 °C, após esse período houve uma redução da viabilidade dos probióticos.

Os resultados não permitiram classificar um método de encapsulação mais eficiente para prolongar a viabilidade dos probióticos encapsulados. Havia uma expectativa da secagem das micropartículas recobertas por interação eletrostática, em estender a viabilidade dos probióticos encapsulados durante a estocagem, entretanto, para esses micro-organismos

estudados a desidratação não proporcionou o aumento da viabilidade quando comparado ao outro método de encapsulação.

Tabela 10 – Viabilidade dos micro-organismos encapsulados por *spray chilling* (SC) e em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE) durante a estocagem a 25 °C por 120 dias. Os valores estão expressos em log UFC/g.

Estocagem (dias)	Tratamentos (log UFC/g)			
	LA-SC	LA-RIE	BLC-SC	BLC-RIE
0	8,53±0,18 ^{Aa}	7,65±0,35 ^{Aa}	8,62±0,26 ^{Aa}	7,89±0,09 ^{Aa}
30	6,98±0,11 ^{Ba}	6,46±0,39 ^{Ba}	7,36±0,25 ^{Ba}	6,95±0,19 ^{Aa}
60	4,49±0,30 ^{Cab}	5,37±0,23 ^{BCa}	4,13±0,11 ^{Cb}	4,70±0,42 ^{Bab}
90	3,50±0,42 ^{Cab}	4,35±0,22 ^{Ca}	3,00±0,14 ^{Db}	3,54±0,34 ^{Cab}
120	NS ^{Da}	NS ^{Da}	NS ^{Da}	NS ^{Da}

Médias de viabilidade seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna, ou seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Tratamentos: **LA-SC** – micropartículas contendo *L. acidophilus* e produzidas por *spray chilling*, **LA-RIE** – micropartículas contendo *L. acidophilus* e recobertas por interação eletrostática, **BLC-SC** – micropartículas contendo *B. animalis* subsp. *lactis* e produzidas por *spray chilling*, **BLC-RIE** – micropartículas contendo *B. animalis* subsp. *lactis* e recobertas por interação eletrostática. Fonte: Própria autoria.

*NS: população bacteriana abaixo do limite de detecção do método que é 2,7 log UFC/g.

Do mesmo modo, Shoji et al. (2013) avaliaram a estocagem a 37 °C de *L. acidophilus* encapsulado por coacervação complexa seguido por liofilização, e após 60 dias a contagem estava abaixo do limite de detecção do método. Em contraste, Oliveira et al. (2007b) encapsularam probióticos pelo mesmo método mencionado anteriormente, porém, empregando a secagem em leite fluidizado. Após 60 dias de estocagem a 37 °C, as contagens das populações de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsulados foram 4,30 e 5,78 log UFC/g, respectivamente, e no período final de estocagem (120 dias) a enumeração ficou abaixo do limite de detecção.

Em relação à estocagem em temperatura ambiente das micropartículas produzidas por *spray chilling*, resultados similares foram obtidos por Pedroso et al. (2012) que armazenaram as micropartículas probióticas obtidas a 37 °C por 90 dias. As enumerações das populações de *B. lactis* e *L. acidophilus* encapsulados foram de 2,53 e 5,11 log UFC/g, respectivamente, no período final de estocagem.

5.3.6 Avaliação da resistência dos probióticos encapsulados ou livres em diferentes condições de stress: pH, NaCl, sacarose e temperatura

Essas análises foram realizadas com a finalidade de verificar se os métodos de encapsulação estudados protegeram os micro-organismos em diferentes condições de stress. A Figura 18 apresenta o efeito de diferentes valores de pH na sobrevivência dos probióticos livres ou encapsulados. A resistência do *L. acidophilus* LA3 não encapsulado em pH 2 foi de aproximadamente 60% (Figura 18a), após 3h de ensaio, enquanto os métodos de encapsulação protegeram as células probióticas apresentando sobrevivência superior a 95%. No pH 4,5 (Figura 18c), ambos os métodos de encapsulação protegeram *L. acidophilus* LA3, assim os valores determinados após 3h de análise, não foram estatisticamente diferentes. Por outro lado, as populações de probióticos não encapsuladas reduziram significativamente ($p>0,5$) considerando a contagem das populações de probióticos no tempo inicial. No pH 7, não foi observado diferença significativa nas contagens das populações de probióticos recobertos por interação eletrostática (Figura 18e e 18f), demonstrando que o método de encapsulação protegeu os probióticos. Entretanto, as contagens das populações dos probióticos não encapsulados ou encapsulados por *spray chilling* apresentaram diferenças significativas após 3h. Todavia, no pH 7, pelo menos 90% das populações de probióticos sobreviveram ao final da análise.

A Figura 18b apresenta a enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 não encapsulado em pH 2. Nessas condições, a sobrevivência dos probióticos foi de aproximadamente 55%, após 3h de ensaio. Os métodos de encapsulação foram eficientes para a proteção do micro-organismo, pois a resistência foi acima de 90%. Entre os métodos de encapsulação estudados, a partícula lipídica recoberta por interação eletrostática de polímeros foi mais efetiva, porque não houve diferença significativa dos probióticos encapsulados comparados à população inicial ($p<0,5$). A Figura 18d apresenta a influência do pH 4,5 para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 livre ou encapsulado, dessa forma, a sobrevivência para os probióticos livres foi de 85%, enquanto para as células encapsuladas foi acima de 95%. Por outro lado, no pH 7 a sobrevivência foi superior para todos os tratamentos ($>90\%$), e não foi observada diferença significativa para os probióticos encapsulados.

Portanto, os métodos de encapsulação foram efetivos para a proteção dos probióticos, especialmente para o pH 2, que foi a condição mais deletéria para os probióticos estudados. Por outro lado, no pH 4,5 e 7 os probióticos não encapsulados apresentaram boa resistência, apesar da diferença significativa entre a população de probióticos inicial.

Figura 18 – Análise da resistência dos probióticos encapsulados ou livres em diferentes valores de pH, no tempo inicial e após 3h de ensaio.

Nessa figura, os tratamentos foram denominados: **LA-F** (LA não encapsulado), **LA-SC** (MSL contendo LA), **LA-RIE** (PLRIE contendo LA), **BLC-F** (BLC não encapsulado), **BLC-SC** (MSL contendo BLC), e **BLC-RIE** (PLRIE contendo BLC). Barras com asterisco diferem significativamente quando comparadas a população de probióticos inicial. Fonte: Própria autoria.

Fávaro-Trindade e Grosso (2000) avaliaram a tolerância dos probióticos livres ou encapsulados, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, em esferas de alginato de cálcio, em valores de pH similares ao estômago. No pH 2, os probióticos livres e encapsulados foram resistentes, sendo que ambas as populações de probióticos reduziram

aproximadamente 1 log UFC/mL. Resultados similares foram determinados por Chotiko e Sathivel (2016), que encapsularam *Lactobacillus plantarum* por gelificação ionotrópica combinando pectina e farelo de arroz. No pH 3 após 2 h de ensaio, a redução das células livres foi de 1 log UFC/g demonstrando boa resistência, entretanto, a encapsulação utilizando os polímeros foi mais efetiva para a proteção das células, que não reduziram a população inicial.

O efeito do cloreto de sódio (NaCl) foi avaliado em diversas concentrações, como 3%, 6% e 9%, como pode ser visualizado na Tabela 11. Esse ensaio permite verificar a aplicação das micropartículas em alimentos que apresentam NaCl em sua composição, como produtos cárneos ou queijos. As contagens das populações de LA3 e BLC1 livres, na concentração de 3% de NaCl, apresentaram redução de aproximadamente 0,3 log UFC/g e 0,5 log UFC/g das células viáveis, após 3h de ensaio. Os métodos de encapsulação estudados protegeram os probióticos nessas mesmas condições, e, portanto, a redução da viabilidade dos probióticos foi inferior às células livres. Aumentando a concentração de NaCl, a resistência das células livres foi reduzida, demonstrando a sensibilidade dos probióticos em meios com alta salinidade. Os métodos de encapsulação não foram suficientes para a proteção dos probióticos na concentração de 9% de NaCl, pois as contagens das populações dos probióticos após o ensaio foi significativamente diferente das populações iniciais. Apesar desses resultados não serem positivos, essa concentração de sal não é utilizada em alimentos, ainda mais com as políticas de incentivo da redução dos níveis de sódio em alimentos processados. Portanto, a intenção da análise da resistência dos probióticos em 9% de NaCl foi avaliar se mesmo em condições mais drásticas a encapsulação pode preservar os probióticos do meio, porém os métodos de encapsulação não foram eficazes para a proteção dos micro-organismos estudados.

Outros trabalhos avaliaram a resistência dos probióticos livres ou encapsulados em meio salino. Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014) encapsularam *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus paraplantarum* por coacervação complexa utilizando isolado de proteína do soro de leite e goma arábica. A tolerância em soluções salinas foi avaliada, e a encapsulação protegeu as células probióticas em diferentes concentrações de NaCl. As populações de probióticos não encapsulados em meio contendo 9% de NaCl reduziram aproximadamente 6 log UFC/g das células viáveis. Entretanto, para os probióticos encapsulados, as populações de probióticos reduziram entre 3 – 2,5 log UFC/g das células viáveis. No presente estudo, as células livres em meio contendo 9% de NaCl reduziram

aproximadamente 1,5 log UFC/g das células viáveis. As populações de probióticos encapsulados reduziram aproximadamente 0,5 log UFC/g das células viáveis. Esses resultados diferiram, porque foram utilizados outros probióticos, considerando que algumas cepas apresentam maior tolerância as soluções salinas.

Concentrações de sacarose podem afetar a sobrevivência da população de probióticos, pois a mudança da osmolaridade do meio compromete algumas funções essenciais das células (SUNNY-ROBERTS; KNORR, 2008). Além disso, as estruturas das partículas podem ser alteradas no meio contendo carboidratos de baixo peso molecular, alterando a hidratação dos polissacarídeos e proteínas (COMUNIAN et al., 2016). Portanto, essa análise também deve ser considerada previamente a aplicação em alimento que contenha sacarose, como o chocolate meio amargo. Os resultados estão apresentados na Tabela 12. A encapsulação foi eficiente para manter as contagens das populações dos probióticos na concentração de 10%, comparando com os probióticos não encapsulados no mesmo meio. Em alta concentração de sacarose (45%), a redução da contagem das populações de probióticos foi maior, aproximadamente 0,5 log UFC/g, independentemente se os probióticos estavam na forma livre ou encapsulada. Entretanto, mesmo após 3 h de ensaio, os valores obtidos foram acima de 6 log UFC/g, que é a mínima dose indicada para o consumo.

Outros trabalhos verificaram a influência das soluções açucaradas sob a viabilidade dos probióticos. Sunny-Roberts e Knorr (2008) avaliaram a tolerância de *Lactobacillus rhamnosus* em diferentes concentrações de sacarose, e observaram que concentrações acima de 1,2 M reduziram a viabilidade dos probióticos. Os autores consideraram esses valores relevantes para a aplicação em alimentos açucarados. Nesse contexto, as populações dos probióticos estudados, *Lactobacillus acidophilus* (LA3) e *Bidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BLC1), em condição similar a quantidade de açúcar presente em chocolate meio amargo (45% de sacarose), apresentaram redução da viabilidade, após 3 h de ensaio. Entretanto, essa análise é muito simplificada quando comparada a essa matriz alimentícia, que é composta por outros ingredientes que podem proteger os probióticos.

Tabela 11 – Contagens dos probióticos encapsulados e não encapsulados, no início e depois de 3 h de incubação em diferentes concentrações de NaCl, expressos como log UFC/g.

Tratamentos	NaCl 3%		NaCl 6%		NaCl 9%	
	t= 0	t= 3h	t= 0	t= 3h	t= 0	t= 3h
LA-F	8,6±0,06 ^{Aa}	7,87±0,06 ^{Ab}	8,19±0,09 ^{ABa}	7,60±0,11 ^{ABb}	8,14±0,06 ^{Aa}	6,95±0,08 ^{DEb}
LA-SC	7,88±0,03 ^{Aa}	7,76±0,08 ^{ABa}	7,91±0,08 ^{BCa}	7,74±0,03 ^{Aa}	7,89±0,04 ^{BCa}	7,67±0,04 ^{Ab}
LA-RIE	7,70±0,03 ^{Ca}	7,49±0,12 ^{Ba}	7,80±0,03 ^{Ca}	7,41±0,04 ^{BCb}	7,74±0,05 ^{Ca}	7,19±0,05 ^{CDb}
BLC-F	8,32±0,05 ^{Aa}	7,86±0,06 ^{Ab}	8,31±0,10 ^{Aa}	7,37±0,05 ^{Bcb}	8,32±0,02 ^{Aa}	6,69±0,06 ^{Eb}
BLC-SC	8,17±0,02 ^{Aa}	7,94±0,02 ^{Ab}	8,08±0,10 ^{ABCa}	7,78±0,06 ^{Aa}	8,21±0,06 ^{Aa}	7,59±0,05 ^{ABb}
BLC-RIE	7,84±0,06 ^{BCa}	7,64±0,06 ^{ABa}	7,87±0,04 ^{BCa}	7,32±0,02 ^{Cb}	7,93±0,04 ^{Aa}	7,36±0,11 ^{BCb}

Valores com a mesma letra maiúscula na mesma linha e com a mesma letra minúscula na mesma coluna não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Nessa tabela os tratamentos foram designados como: **LA-F** - células de *L. acidophilus* não encapsuladas; **LA-SC** - *L. acidophilus* encapsulado por *spray chilling*; **LA-RIE** - *L. acidophilus* em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE); **BLC-F** - Células de *B. animalis* subsp. *lactis* não encapsuladas; **BLC-SC** - *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado por *spray chilling*; **BLC-RIE** - *B. animalis* subsp. *lactis* em PLRIE. Fonte: Própria autoria.

Tabela 12 – Contagens dos probióticos encapsulados e não encapsulados, no início e depois de 3 h de incubação, em diferentes concentrações de sacarose, expressos como log UFC/g.

Tratamentos	Sacarose 10%		Sacarose 25%		Sacarose 45%	
	t= 0	t= 3h	t= 0	t= 3h	t= 0	t= 3h
LA-F	8,11±0,04 ^{BAa}	7,87±0,06 ^{ABb}	8,09±0,08 ^{ABa}	7,88±0,08 ^{Aa}	8,05±0,06 ^{Aa}	7,48±0,08 ^{ABb}
LA-SC	7,87±0,05 ^{BCa}	7,69±0,05 ^{Ca}	7,86±0,01 ^{Ba}	7,28±0,08 ^{Bb}	7,86±0,06 ^{Aa}	7,63±0,04 ^{Ab}
LA-RIE	7,75±0,04 ^{Ca}	7,69±0,01 ^{Ca}	7,77±0,03 ^{Ba}	7,73±0,02 ^{Aa}	7,77±0,04 ^{Aa}	7,29±0,08 ^{Bb}
BLC-F	8,31±0,13 ^{Aa}	7,88±0,04 ^{ABb}	8,24±0,11 ^{Aa}	7,89±0,04 ^{Aa}	8,22±0,19 ^{Aa}	7,57±0,14 ^{ABa}
BLC-SC	8,18±0,04 ^{Aa}	7,95±0,03 ^{Ab}	8,05±0,14 ^{ABa}	7,92±0,03 ^{Aa}	8,08±0,17 ^{Aa}	7,51±0,04 ^{ABb}
BLC-RIE	7,89±0,09 ^{BCa}	7,76±0,04 ^{BCa}	7,88±0,11 ^{ABa}	7,78±0,03 ^{Aa}	7,89±0,05 ^{Aa}	7,39±0,05 ^{ABb}

Valores com a mesma letra maiúscula na mesma linha e com a mesma letra minúscula na mesma coluna não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Nessa tabela os tratamentos foram designados como: **LA-F** - células de *L. acidophilus* não encapsuladas; **LA-SC** - *L. acidophilus* encapsulado por *spray chilling*; **LA-RIE** - *L. acidophilus* em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE); **BLC-F** - Células de *B. animalis* subsp. *lactis* não encapsuladas; **BLC-SC** - *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado por *spray chilling*; **BLC-RIE** - *B. animalis* subsp. *lactis* em PLRIE. Fonte: Própria autoria.

Tratamentos térmicos são responsáveis por reduzir as contagens das populações dos probióticos, entretanto, foi investigado se a microencapsulação poderia protegê-los a 50 °C. A Figura 19 apresenta as contagens das populações dos probióticos livres ou encapsulados a 50 °C durante 1 h de ensaio. As contagens das populações dos probióticos diferiram após 60 min de ensaio para todos os tratamentos investigados. Entretanto, as contagens das populações dos probióticos encapsulados foram superiores. As taxas de sobrevivência dos probióticos não encapsulados LA3 e BLC1 foram respectivamente 80% e 76%, enquanto os probióticos encapsulados apresentaram taxas de sobrevivência acima de 90%.

Figura 19 – Efeito da temperatura (T= 50 °C) na sobrevivência dos probióticos livres ou encapsulados, incubados por 60 min.

Nessa figura, os tratamentos foram denominados: **LA-F** - células de *L. acidophilus* não encapsuladas; **LA-SC** - *L. acidophilus* encapsulado por *spray chilling*; **LA-RIE** - *L. acidophilus* em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (PLRIE); **BLC-F** - células de *B. animalis* subsp. *lactis* não encapsuladas; **BLC-SC** - *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado por *spray chilling*; **BLC-RIE** - *B. animalis* subsp. *lactis* em PLRIE. Fonte: Própria autoria.

Wang et al. (2015) avaliaram o efeito da pasteurização HTST (*high temperature short time*), sobre *Lactobacillus kefiranofaciens* encapsulados usando a mistura de alginato de sódio, goma gelana e leite desnatado. Após o aquecimento, os probióticos livres não sobreviveram ao procedimento, enquanto a contagem da população do probiótico encapsulado foi de 7,54 log UFC/g. No presente trabalho, as contagens das populações dos probióticos não encapsulados apresentaram redução de aproximadamente 1,5 – 2 log UFC/g, demonstrando uma resistência acima das expectativas, já que as contagens das populações dos probióticos encapsulados reduziram entre 1 – 0,5 log UFC/g.

5.3.7 Avaliação *in vitro* da sobrevivência dos probióticos ao fluido gastrointestinal simulado

O intuito da encapsulação dos probióticos é que eles cheguem vivos ao intestino, para que possam melhorar a microbiota endógena. Entretanto, o processo digestivo apresenta diversas condições adversas, como o pH baixo do fluido gástrico e a presença de enzimas e sais biliares (COOK et al., 2012; FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). A Figura 20 mostra a resistência de *L. acidophilus* livre, encapsulado por *spray chilling* e recoberto por interação eletrostática, durante a exposição ao fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS).

Na Figura 20 observa-se que a população de *L. acidophilus* livre reduziu aproximadamente 2 log UFC/g ao final do tempo de exposição aos fluidos, sendo que durante a exposição ao FGS houve a maior redução. Porém, o micro-organismo encapsulado foi mais resistente ao final da exposição ao FGS. A população de *L. acidophilus* nas MSL, obtidas por *spray chilling*, permaneceu praticamente inalterada durante a exposição ao FGS, e ao final do ensaio reduziu aproximadamente 1,5 log UFC/g, enquanto que a população de *L. acidophilus* recoberto por interação eletrostática reduziu aproximadamente 1 log UFC/g. A menor redução da população de *L. acidophilus* em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática era esperada, porque o micro-organismo foi imobilizado em gordura, e recoberto pela interação da gelatina e goma arábica, ou seja, o recobrimento é uma barreira adicional quando comparado com as micropartículas sólidas lipídicas produzidas por *spray chilling*. Esses resultados comprovam a eficiência da encapsulação para a proteção de *L. acidophilus*, em especial, durante a passagem pelo fluido gástrico simulado, porque as populações dos probióticos não encapsulados, encapsulados por *spray chilling* ou recobertos por interação

eletrostática reduziram respectivamente, 1,8 log UFC/g, 0,3 log UFC/g e manteve-se inalterada. Entretanto, os resultados após 300 min de ensaio demonstraram que os tratamentos não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Alguns compostos presentes no fluido intestinal simulado podem ter ocasionado à redução da viabilidade dos probióticos livres e encapsulados, como os sais biliares que apresentam atividade antimicrobiana (MADUREIRA et al., 2011).

Figura 20 – Sobrevivência aos fluidos gástrico simulado (FGS), durante 120 min de incubação, e intestinal simulado (FIS), durante 180 min de incubação, para o micro-organismo *L. acidophilus* livre (LA-Livre), encapsulado por *spray chilling* (LA-SC) e recoberto por interação eletrostática (LA-RIE).

Barras identificadas com letras maiúsculas iguais para um mesmo tratamento ao longo do tempo, assim como letras minúsculas iguais para um mesmo intervalo de tempo não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Fonte: Própria autoria.

Outros trabalhos verificaram a sobrevivência dos probióticos livres ou encapsulados por *spray chilling* em fluidos gastrointestinais simulados. Okuro et al. (2013) co-encapsularam *L. acidophilus* (LAC-04) e prebióticos, utilizando gordura interesterificada. Após 210 min de ensaio, a contagem para o micro-organismo livre ficou abaixo do limite de detecção do método (< 2 log UFC/g). Ao final do ensaio, as populações de probióticos co-encapsulados com os prebióticos reduziram aproximadamente 3 log UFC/g das células

viáveis. Esses resultados diferiram do presente trabalho, porque foi utilizado *L. acidophilus* (LA3), além disso, outra gordura vegetal foi aplicada como carreador.

A Figura 21 apresenta a resistência de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e encapsulado por *spray chilling* e recobrimento por interação eletrostática frente à exposição aos fluidos gastrointestinais simulados. Avaliando a Figura 21, a contagem da população do probiótico livre apresentou redução de aproximadamente 4 log UFC/g, principalmente após a adição do FIS. O processo de encapsulação promoveu maior sobrevivência do *B. animalis* subsp. *lactis*, sendo que praticamente não houve redução logarítmica na população do micro-organismo encapsulado por *spray chilling*, enquanto para o micro-organismo encapsulado por recobrimento por interação eletrostática houve redução de 1,5 log UFC/g. Esse resultado não era esperado, pois como mencionado anteriormente, as partículas lipídicas apresentavam uma barreira adicional composta pelo polímeros.

Figura 21 – Sobrevivência aos fluidos gástrico (FGS), durante 120 min de incubação, e intestinal simulado (FIS), durante 180 min de incubação, para o micro-organismo *B. animalis* subsp. *lactis* livre (BLC-Livre), encapsulado por *spray chilling* (BLC-SC) ou em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática (BLC-RIE).

Barras identificadas com letras maiúsculas iguais para um mesmo tratamento ao longo do tempo, assim como letras minúsculas iguais para um mesmo intervalo de tempo não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Fonte: Própria autoria.

O potencial da coacervação complexa para a proteção dos probióticos em fluidos gastrointestinais simulados foi avaliado por Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014). Os probióticos, *L. paraplantarum* e *L. paracasei*, foram encapsulados utilizando isolado de proteína do soro de leite e goma arábica. As populações dos probióticos livres reduziram 9 log UFC/g, enquanto que as populações de *L. paraplantarum* e *L. paracasei* encapsulados reduziram 4 log UFC/g e 1 log UFC/g, respectivamente, ao final do ensaio. Esses resultados foram superiores aos encontrados no presente estudo, a população de *B. animalis* subsp. *lactis* livre reduziu 4 log UFC/g, e a população do probiótico em partícula lipídica recoberta por interação eletrostática de polímeros reduziu 2,5 log UFC/g das células viáveis.

Considerando os resultados apresentados, optou-se por trabalhar apenas com a técnica de encapsulação por *spray chilling*, pois promoveu maior proteção aos micro-organismos avaliados. Outros trabalhos também verificaram bons resultados para o ensaio *in vitro* da resistência dos probióticos aos fluidos gastrointestinais simulados ao encapsular o probiótico por *spray chilling* (PEDROSO et al., 2012; OKURO et al., 2013; PEDROSO et al., 2013).

5.4 Caracterizações das amostras de chocolate meio amargo probiótico

A Figura 22 apresenta o aspecto das amostras de chocolate meio amargo probiótico. Como esperado, as amostras adicionadas de células livres apresentaram o mesmo aspecto da amostra controle (sem adição de probióticos). As amostras 3 e 5, que foram adicionadas de MSL probióticas, apresentaram o mesmo aspecto superficial das outras amostras, entretanto, na imagem do corte transversal as partículas aglomeradas podem ser visualizadas dispersas na matriz alimentícia.

A aplicação das partículas probióticas após a temperagem ($T \leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), não alterou a estrutura da partícula. Essa era uma preocupação inicial, porque foi utilizado como carreador a gordura vegetal com ponto de fusão de $48\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se as partículas fossem adicionadas em outra etapa do processamento do chocolate, como a conchagem, poderiam fundir-se, e consequentemente, liberar o probiótico encapsulado. Além disso, apesar da elevada quantidade de partículas que foram adicionadas ao produto (10 g de partículas/100 g de chocolate), o chocolate apresentou um aspecto visual atrativo porque as partículas foram bem homogeneizadas no produto.

Figura 22 – Aspecto das amostras de chocolate meio amargo probiótico.

Nessa figura: **1** – Chocolate controle (sem adição de probióticos), **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* encapsulado, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

5.4.1 Atividade de água e pH das amostras de chocolate

A Tabela 13 apresenta a atividade de água das amostras de chocolate, durante a estocagem dos produtos a 25 °C por 120 dias. Todas as formulações de chocolate apresentaram aumento da atividade de água no decorrer dos 120 dias de estocagem, apesar de todas as formulações apresentarem valores de atividade de água abaixo de 0,6, o que contribui com a segurança microbiológica do chocolate, porque nenhum micro-organismo pode multiplicar-se nessas condições. A amostra controle, quando comparada às amostras de chocolate adicionadas de probióticos, apresentou atividade de água inferior, pois nas amostras de chocolate com probióticos foram utilizadas células bacterianas obtidas de uma suspensão aquosa. Vesterlund, Salminen e Salminen (2012) avaliaram o impacto da atividade de água

em matriz de linhaça triturada com probióticos seguido pela secagem em incubadora de laboratório a 57 °C. Esses autores relataram que baixa a_w , aproximadamente 0,11, estendeu a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* GG, enquanto o mesmo probiótico em um produto com a_w 0,43 foi mais susceptível e teve contagem das populações dos probióticos reduzida em aproximadamente 3,7 log UFC/g após 4 meses de estocagem. Esses resultados diferem aos que estão apresentados no presente estudo (item 5.5.2), pois as contagens das populações dos probióticos livres adicionados nas amostras de chocolate reduziram entre 1,4 – 0,7 log UFC/g após 4 meses de estocagem. Dessa forma, a complexidade da matriz chocolate, que é composta por vários ingredientes, como a manteiga de cacau, compostos fenólicos e açúcar podem ter protegido os probióticos.

Tabela 13 – Valores para atividade de água das amostras de chocolate estocadas a 25 °C por 120 dias.

Amostra	Estocagem (dias)				
	0	30	60	90	120
1	0,36±0,05 ^{Ab}	0,40±0,02 ^{Ab}	0,38±0,01 ^{Ac}	0,37±0,01 ^{Ad}	0,44±0,03 ^{Ac}
2	0,51±0,01 ^{Aa}	0,44±0,02 ^{Bb}	0,43±0,01 ^{BCb}	0,41±0,01 ^{Cc}	0,52±0,01 ^{Ab}
3	0,60±0,04 ^{Aa}	0,51±0,01 ^{BCa}	0,48±0,01 ^{CDa}	0,44±0,01 ^{Dbc}	0,54±0,01 ^{Bab}
4	0,40±0,03 ^{Cb}	0,44±0,03 ^{BCb}	0,43±0,02 ^{BCb}	0,45±0,01 ^{Bab}	0,56±0,01 ^{Aab}
5	0,57±0,03 ^{Aa}	0,52±0,02 ^{ABa}	0,48±0,01 ^{Ba}	0,49±0,03 ^{Ba}	0,58±0,03 ^{Aa}

Médias de a_w das amostras de chocolate seguidas de letra maiúscula iguais na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Médias de a_w seguidas de letra minúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nessa Tabela: **1** – Chocolate controle (sem adição de probióticos), **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

Outro parâmetro que pode influenciar as características do chocolate e também a viabilidade do probiótico é o pH, o qual pode afetar a parede celular do micro-organismos, padrões de transporte e bioenergética celular (KRULWICH; SACHS; PADAN, 2011). Assim, no presente estudo, o pH das amostras de chocolate foram avaliadas durante 120 dias de estocagem a 25 °C, e os resultados são apresentados na Tabela 14. Todas as formulações de chocolate apresentaram valores de pH num intervalo limitado entre 5,66–5,87. O pH das amostras 3 e 4, adicionada das MSL de *L. acidophilus* e adicionada de *B. animalis* subsp. *lactis* livre, respectivamente, aumentou durante a estocagem. Entretanto, nas outras amostras, as bactérias probióticas não alteraram o pH, indicando que possivelmente estavam

metabolicamente inativas durante a estocagem, devido ao baixo valor de a_w , como anteriormente discutido. De acordo com Lahtinen et al. (2005), os probióticos podem ficar metabolicamente inativos durante a estocagem.

Tabela 14 – pH das amostras de chocolate estocadas a 25°C por 120 dias.

Amostra	Estocagem (dias)				
	0	30	60	90	120
1	5,70±0,04 ^{Aa}	5,74±0,04 ^{Aa}	5,76±0,02 ^{Aab}	5,71±0,05 ^{Ab}	5,75±0,05 ^{Aa}
2	5,66±0,06 ^{Aa}	5,74±0,03 ^{Aa}	5,73±0,02 ^{Ab}	5,74±0,05 ^{Ab}	5,73±0,04 ^{Aa}
3	5,72±0,05 ^{Ba}	5,80±0,05 ^{ABa}	5,77±0,02 ^{ABab}	5,87±0,02 ^{Aa}	5,79±0,03 ^{ABa}
4	5,72±0,03 ^{Ca}	5,82±0,02 ^{Aa}	5,75±0,02 ^{BCab}	5,72±0,02 ^{Cb}	5,78±0,03 ^{ABa}
5	5,80±0,10 ^{Aa}	5,74±0,03 ^{Aa}	5,78±0,02 ^{Aa}	5,80±0,04 ^{Aab}	5,82±0,03 ^{Aa}

Médias de pH das amostras de chocolate seguidas de letra maiúscula iguais na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Médias de pH seguidas de letra minúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nessa Tabela: **1** – Chocolate controle (sem adição de probióticos), **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

5.4.2 Determinação do teor total de gordura e fenólicos das amostras de chocolate

Os compostos fenólicos presentes em alimentos apresentam diversos benefícios à saúde relacionados à capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antiestrogênica, entre outros. Esses compostos são biotransformados pela microbiota intestinal, sendo que esse mecanismo é importante para a absorção e modulação da atividade biológica dos fenólicos. Por outro lado, a interação da microbiota intestinal com os compostos fenólicos também pode potencializar a modulação da população microbiana presente no trato gastrointestinal (SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2009). Nesse sentido, as amostras de chocolate produzidas nesse estudo também foram caracterizadas a respeito do teor total de fenólicos e gordura, os resultados são apresentados na Tabela 15.

O teor total de gordura para as amostras de chocolate controle (amostra 1) e adicionadas de probióticos livres (amostras 2 e 4) foi de aproximadamente 31,5%, enquanto as amostras de chocolate adicionadas das MSL probióticas apresentaram um teor de gordura superior de aproximadamente 38,7% como já esperado pois foram adicionadas aproximadamente 10 g de MSL/100 g de chocolate.

O teor total de fenólicos para as amostras controle e contendo probióticos livres foi de aproximadamente 16,7 mg AGE/g de chocolate, diferindo estatisticamente das amostras contendo MSL probióticas. Nessas amostras foi observado um teor de aproximadamente 12,4 mg AGE/g de chocolate. Esses valores foram inferiores devido à composição das amostras de chocolate que continham um teor mais elevado de gordura.

Esses valores foram similares aos resultados observados por Miller et al. (2006), que analisaram o teor total de fenólicos e gordura de amostras de chocolate comerciais vendidos nos Estados Unidos da América. De acordo com esses autores, o teor total de gordura de chocolate meio amargo variou de 29,0 – 29,8%, e o teor total de fenólicos variou entre 11,8 – 12,9 mg AGE/g de produto. Similarmente, Gültekin-Özgüven, Berktaş e Özçelik (2016) avaliaram o teor total de fenólicos de cacau em pó durante algumas etapas de fabricação. Esses autores relataram que a torrefação de grãos de cacau foi responsável pela perda de aproximadamente 65% dos compostos fenólicos. Entretanto, apesar da perda de compostos fenólicos durante o processo, o cacau em pó apresentou altos valores de compostos fenólicos.

Tabela 15 – Teor total de fenólicos (TTF) e gordura (TTG) das amostras de chocolate estocadas a 25 °C (média $\pm$ desvio padrão).

Amostra	TTF (mg ácido gálico equivalente (AGE)/g chocolate)		TTG (%)
1	16,98 $\pm$ 0,32 ^a		31,34 $\pm$ 0,66 ^b
2	16,69 $\pm$ 0,49 ^a		31,60 $\pm$ 0,46 ^b
3	12,48 $\pm$ 0,16 ^b		38,91 $\pm$ 0,54 ^a
4	16,52 $\pm$ 0,67 ^a		31,58 $\pm$ 0,58 ^b
5	12,43 $\pm$ 0,23 ^b		38,43 $\pm$ 0,40 ^a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nessa Tabela: **1** – Chocolate controle (sem adição de probióticos), **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* encapsulado, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

5.4.3 Cor superficial e dureza das amostras de chocolate

Dureza é um parâmetro físico que influencia na aceitação dos consumidores de chocolate, e está relacionado com os ingredientes e o processo de temperagem. No presente estudo, a dureza foi avaliada durante o período de estocagem das amostras de chocolate. De acordo com os resultados apresentados na Figura 23, a adição de probióticos não afetou a textura das amostras quando comparado com a amostra controle no início do período de estocagem. Entretanto, as amostras 1 (controle) e 4 (adicionada de *B. animalis* subsp. *lactis* na forma livre) apresentaram aumento significativo da dureza após 120 dias de estocagem. Em contraste, as amostras de chocolate acrescidas das MSL probióticas reduziu pela metade a dureza quando comparadas com as amostras de chocolate acrescidas das células livres ou a amostra controle, e, portanto o maior teor de gordura das amostras pode ter influenciado esse parâmetro. Foong et al. (2013) produziram amostras de chocolate amargo com e sem probióticos, e observaram que a amostra de chocolate sem probiótico foi mais dura que a amostra com adição de probiótico.

Figura 23 – Dureza das amostras de chocolate, expressos em N, antes e após a estocagem de 120 dias à 25°C.

Nessa figura: **1** – Chocolate controle (sem adição de probióticos), **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Aumento significativo dos valores comparado ao tempo inicial foi destacado com asterisco. Fonte: Própria autoria.

Fat bloom é um fenômeno que pode ocorrer em chocolate e vem sendo estudado, pois o seu mecanismo não foi totalmente elucidado (SONWAI & ROUSSEAU, 2010). Chocolate com *fat bloom* apresenta uma camada esbranquiçada na superfície, o que pode ser correlacionado com o índice de brancura. No presente estudo, as amostras de chocolate foram avaliadas a respeito do índice de brancura por 120 dias de estocagem, e os resultados são apresentados na Figura 24. O índice de brancura aumentou durante o período de estocagem em todas as amostras, indicando a ocorrência de *fat bloom* provavelmente devido aos procedimentos de temperagem, que afetam diretamente o desenvolvimento desse defeito.

A amostra controle também apresentou esse aumento, demonstrando que a presença dos probióticos não influenciou no desenvolvimento do *fat bloom*. O *fat bloom* pode ser evitado com um controle rigoroso do processo de temperagem, por exemplo utilizando temperadeiras mecânicas e com a aplicação de embalagem adequada para longos períodos de armazenamento.

Figura 24 – Índice de brancura (IB) das amostras de chocolate antes e após o período de estocagem.

Nessa figura: **1** – Chocolate controle (sem adição de probióticos), **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Aumento significativo dos valores comparado ao tempo inicial foi destacado com asterisco. Fonte: Própria autoria.

5.4.4 Morfologia da superfície das amostras de chocolate utilizando microscopia eletrônica de varredura

A Figura 25 apresenta as micrografias obtidas por MEV da superfície das amostras de chocolate. Foi possível verificar a formação dos cristais de gordura, *fat bloom*, após 120 dias de armazenamento à 25°C. Esse resultado pode ser correlacionado com a determinação do índice de brancura das amostras, que também aumentou durante a estocagem demonstrando a evolução do *fat bloom* das amostras de chocolate produzidas.

No início da estocagem, as superfícies das amostras eram similares. Entretanto, ao final do período de estocagem, as superfícies das amostras apresentavam cristais de gordura, os quais podem ter se fundido na matriz e migrado para a superfície do produto, se cristalizando novamente. Nas amostras de chocolate contendo probióticos livres foram detectados cristais maiores, quando comparado com a amostra controle. Entretanto, os menores cristais de gordura após 120 dias de estocagem foram observados nas amostras contendo as MSL probióticas (Fig. 25F e 25J). A ocorrência desse fenômeno pode ser relacionada com a adição de probióticos ou das MSL probióticas durante o processo de temperagem, o qual pode influenciar na recristalização dos lipídios. Além disso, não era possível adicionar os probióticos antes da temperagem para evitar esse defeito, pois os processos prévios empregam temperaturas altas por longos períodos o que poderia reduzir consideravelmente a viabilidade das células bacterianas.

Lopes (2015) verificou que a adição de MSL na massa de chocolate meio amargo durante a etapa de temperagem, produziu chocolate com características semelhantes ao chocolate obtido pela temperagem convencional. Ademais, a principal vantagem da aplicação das MSL foi à redução de 66% do tempo dessa etapa, o que para a indústria pode representar economia de energia e tempo.

Figura 25 – Micrografias das amostras de chocolate probiótico, no tempo inicial (coluna esquerda) e após 120 dias (coluna direita) de estocagem.

Figura 25 – Continuação.

Nessa figura: **A** – Chocolate controle (sem adição de probióticos) no tempo inicial, **B** – Chocolate controle após 120 dias, **C** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre no tempo inicial, **D** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre após 120 dias, **E** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus* no tempo inicial, **F** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus* após 120 dias, **G** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre no tempo inicial, **H** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre após 120 dias, **I** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado no tempo inicial e **J** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado após 120 dias. Fonte: Própria autoria.

5.5 Análises microbiológicas das amostras de chocolate

5.5.1 Qualidade microbiológica das amostras de chocolate

Antes da análise sensorial de novos alimentos é necessário analisar a qualidade microbiológica das amostras para garantir a segurança dos provadores. Esse controle é necessário, pois alguns surtos de salmonelose estão associados à ingestão de chocolate

(WERBER et al., 2005). As características físico-químicas do chocolate, como a baixa a_w e teor de gordura, impedem a multiplicação da *Salmonella*, mas não a elimina, podendo manter-se viável durante a estocagem. A principal etapa do processamento do chocolate para eliminação do patógeno é a torrefação, onde a matéria prima é submetida a temperaturas entre 110 – 140 °C (KAMPHUIS, 2009). Entretanto, pode ocorrer a recontaminação nas etapas seguintes, como no refino do líquido de cacau ou ao adicionar outros ingredientes crus como avelãs, amêndoas e frutas secas. Nesse contexto, as indústrias produtoras de chocolate precisam tomar medidas para adequar o processo considerando os programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (IZURIETA; KOMITOPOULOU, 2012).

De acordo com a RDC nº 12 da ANVISA (2001), os limites estabelecidos para os parâmetros microbiológicos do chocolate são de 10 NMP/g coliformes a 45 °C, 5×10^2 UFC/g para *Staphylococcus aureus* e ausência de *Salmonella* em 25 g. No presente estudo, as enumerações de coliformes termotolerantes e a detecção de *Salmonella* spp. foram realizadas nas amostras de chocolate. Não foi detectado nenhum dos patógenos avaliados nas amostras de chocolate, indicando que os produtos foram elaborados seguindo as BPF, sendo seguros para o consumo.

Resultados similares quanto a ausência de *Salmonella* em chocolate foram determinadas por Reolon et al. (2012), que analisaram a qualidade microbiológica de 65 amostras de chocolate comercializadas em Campinas – São Paulo. Entretanto, 20% das amostras estavam contaminadas por enterobactérias, demonstrando a necessidade de controle rigoroso dos programas de BPF das indústrias produtoras de chocolate.

5.5.2 Viabilidade dos probióticos nas amostras de chocolate durante a estocagem a 25 °C

A viabilidade dos probióticos nas amostras de chocolate meio amargo foi avaliada durante 120 dias de estocagem a 25 °C, os resultados podem ser visualizados na Tabela 16. Durante a estocagem não houve redução significativa das populações de probióticos presentes na formulação 4, que foi adicionada de *B. animalis* subsp. *lactis* BLC1 não encapsulado, apresentando contagem de aproximadamente 7,7 log UFC/g. A formulação 2, que foi acrescentada da população de *L. acidophilus* LA3 livre, obteve contagem de 7,3 log UFC/g das células viáveis, não havendo diferença significativa no período de 120 dias de estocagem em relação a formulação 4. A incorporação das MSL probióticas ocorreu nas formulações 3 e 5, sendo que as contagens das populações dos probióticos variaram entre 5,9 – 6,2 log UFC/g,

no período de 60 dias de estocagem. Após o período mencionado, a viabilidade dos probióticos encapsulados foi reduzida, e a enumeração ficou abaixo do limite de detecção do método (2,7 log UFC/g) no período de 120 dias.

De maneira similar, Mandal et al. (2013) microencapsularam *Lactobacillus casei* NCDC 298 utilizando alginato de sódio, em seguida as partículas probióticas foram adicionadas em chocolate ao leite, e como amostra controle foi adicionada a mesma cepa não encapsulada em chocolate. Durante a estocagem dos produtos a 7 °C por 60 dias, foi verificado que a microencapsulação não prolongou a viabilidade dos probióticos, comparado ao tratamento controle. Esses resultados são similares ao presente trabalho, que verificou que a microencapsulação não prolongou a viabilidade das células quando aplicados em chocolate.

A alta viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* BLC1 em chocolate pode ser explicada pelo elevado teor de gordura (31%) e compostos fenólicos na matriz alimentícia, que foram eficientes para proteger os micro-organismos da fase aquosa, e possivelmente do oxigênio atmosférico, considerando o metabolismo anaeróbio desse probiótico. Nebesny et al. (2007) produziram amostras de chocolate amargo probiótico com *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, que foram estocadas pelo período de 12 meses a 30, 18 e 4 °C. Esses autores apresentaram resultados similares aos obtidos no presente estudo, as populações bacterianas permaneceram estáveis (6 – 7 log UFC/g) durante o período de estocagem. Por outro lado, Kemsawasd, Chaikham e Rattanasena (2016) encapsularam *Lactobacillus casei* 01 e *Lactobacillus acidophilus* LA5 por *spray drying* utilizando maltodextrina e leite desnatado, e incorporaram as partículas probióticas obtidas em chocolate amargo, ao leite e branco. No tempo inicial as contagens dos probióticos em chocolate era de aproximadamente 8 log UFC/g. Entretanto, após 40 dias de estocagem a 25 °C, a enumeração de *L. acidophilus* estava abaixo do limite de detecção, e as amostras de chocolate adicionadas de *L. casei* apresentaram contagens de aproximadamente 3 log UFC/g. Portanto, comparando esses resultados com o presente trabalho, a prévia microencapsulação por *spray chilling* dos probióticos para incorporação em amostras de chocolate meio amargo, manteve a viabilidade dos probióticos encapsulados por um período maior.

Tabela 16 – Viabilidade dos probióticos livres (formulações 2 e 4) e encapsulados (formulações 3 e 5) adicionados em amostras de chocolate meio amargo durante a estocagem de 120 dias a 25°C. Os valores foram expressos como log UFC/g de chocolate.

Amostras	Dias de armazenamento				
	0	30	60	90	120
2	8,69±0,29 ^{Aa}	7,99±0,20 ^{ABCa}	8,24±0,08 ^{ABa}	7,65±0,07 ^{BCa}	7,29±0,16 ^{Ca}
3	7,01±0,21 ^{Ab}	7,07±0,17 ^{Ab}	6,20±0,28 ^{Ab}	4,41±0,57 ^{Bb}	NS ^{Cb}
4	8,44±0,48 ^{Aa}	8,05±0,07 ^{Aa}	8,24±0,34 ^{Aa}	7,94±0,34 ^{Aa}	7,74±0,20 ^{Aa}
5	7,08±0,11 ^{Ab}	6,81±0,10 ^{Ab}	5,90±0,21 ^{Bb}	4,63±0,25 ^{Cb}	NS ^{Db}

Valores com a mesma letra maiúscula na mesma linha e com a mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nessa Tabela: **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. *NS: população bacteriana abaixo do limite de detecção do método que é 2,7 log UFC/g. Fonte: Própria autoria.

Os resultados do presente estudo indicam que o pH de aproximadamente 5,7 e a baixa a_w mantiveram os probióticos em baixa atividade metabólica. Além disso, o alto teor de gordura e compostos fenólicos, compostos antioxidantes responsáveis por reduzir o stress oxidativo, podem também ter auxiliado na manutenção da viabilidade dos probióticos em chocolate (PEDROSO et al., 2013; TZOUNIS et al., 2011). A vida de prateleira das formulações adicionadas dos probióticos encapsulados foi de 60 dias, pois durante esse período as contagens das populações de probióticos foram superiores a 6 log UFC/g. Esses resultados foram influenciados pela a_w relativamente alta das MSL ocasionando o declínio das populações de probióticos durante a estocagem a 25 °C.

5.5.3 Sobrevivência dos probióticos livres e encapsulados em chocolate quando adicionados ao fluido gastrointestinal simulado

Matrizes alimentares podem conferir adicional proteção aos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). A Figura 26 apresenta a sobrevivência dos probióticos livres (amostras 2 e 4) e encapsulados (amostras 3 e 5) em chocolate meio amargo quando expostos aos fluidos gastrointestinais simulados. As amostras de chocolate contendo micro-organismos na forma livre, não apresentaram redução significativa das contagens das populações dos probióticos, demonstrando que a matriz alimentícia protegeu os probióticos das condições simuladas ao trato gastrointestinal. Por outro lado, a amostra de chocolate adicionada das MSL contendo *B. animalis* subsp. *lactis*

(amostra 5) apresentou uma redução da viabilidade estatisticamente significativa após 300 min de ensaio, aproximadamente 1,1 log UFC/g em relação ao tempo inicial. No entanto, a amostra 3 que foi adicionada de MSL contendo *L. acidophilus*, as contagens das populações do probiótico se mantiveram durante o ensaio. Havia uma expectativa que a microencapsulação aumentasse a sobrevivência dos probióticos quando submetidos aos fluidos gastrointestinais simulados, entretanto, as contagens das populações dos probióticos livres se mantiveram durante o ensaio. Além disso, os resultados da sobrevivência dos probióticos livres em fluidos gastrointestinais simulados (apresentado na seção 5.3.6) comparados aos presentes resultados demonstram o aumento da resistência das populações dos probióticos quando incorporados na matriz alimentar. Esse efeito protetor durante o ensaio gastrointestinal simulado pode ser explicado devido à interação entre os probióticos e os ingredientes do chocolate, como a gordura e compostos fenólicos. Portanto, a matriz alimentícia influenciou na manutenção da viabilidade dos probióticos durante o ensaio, e a microencapsulação prévia dos probióticos não resultou em uma proteção adicional.

Outros trabalhos também verificaram a sobrevivência dos probióticos adicionados ao chocolate em ensaio gastrointestinal simulado. Possemiers et al. (2010) observaram ótimas taxas de sobrevivência de *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum* em chocolate ao leite, aproximadamente 91% e 80% respectivamente, ao ensaio *in vitro* da passagem pelo trato gastrointestinal. No entanto, Klindt-Toldam et al. (2016) verificaram contagens inferiores para *Lactobacillus acidophilus* NCFM adicionados em chocolate ao leite e amargo. No tempo inicial, a população do probiótico apresentava 8 log UFC/g de células viáveis. Após o ensaio gástrico simulado de 65 min, a população do micro-organismo adicionado em chocolate amargo foi de 5,4 log UFC/g, enquanto que a enumeração do probiótico no chocolate ao leite estava abaixo do limite de detecção do método (< 3 log UFC/g). Portanto, esses resultados demonstraram que o tipo de chocolate, ou seja, o teor de cacau implica na sobrevivência dos probióticos durante o ensaio gastrointestinal simulado.

Figura 26 – Sobrevivência dos probióticos livres (amostras 2 e 4) e encapsulados (amostras 3 e 5) acrescentados em chocolate meio amargo, quando adicionados em fluidos gastrointestinais simulados, expressos em log UFC/g.

Barras seguidas de letra maiúscula iguais da mesma formulação não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras seguidas de letra minúscula iguais no mesmo intervalo de tempo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nessa figura: **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que o chocolate meio amargo é uma matriz alimentícia com potencial para proteção das células probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Alguns mecanismos de interação entre o chocolate e os probióticos podem ser propostos para explicar o efeito protetor desse produto. Uma possível interação é a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes no líquido de cacau, evitando o stress oxidativo, assim reduzindo a morte celular (MAUKONEN; SAARELA, 2015; TZOUNIS et al., 2011). Outra possível interação ocorre com os probióticos e a manteiga de cacau, o que pode contribuir com a liberação dos micro-organismos no intestino durante a digestão da gordura. Nesse contexto, a manteiga de cacau já foi investigada como material encapsulante protegendo as populações dos probióticos (LAHTINEN et al., 2007; PEDROSO et al. 2013). Além disso, o alto teor de açúcar no chocolate (47%) pode servir como tampão aos fluidos gastrointestinais durante a digestão (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Portanto, o chocolate é uma matriz alimentícia que protegeu os probióticos durante o ensaio gastrointestinal simulado. Ademais, o produto apresentou baixa atividade de água, possibilitando a manutenção dos micro-organismos em estado latente. Outra característica do produto que pode ter influenciado a preservação das células probióticas é a presença de antioxidantes naturais que permitem reduzir o stress oxidativo.

5.5.4 Análise sensorial das amostras de chocolate

Previamente a análise sensorial das amostras de chocolate, foi entregue ao provador um questionário (Apêndice C) para determinar o perfil de preferência dos provadores, o que pode ser correlacionado com a aceitação ou não do produto. As respostas para cada quesito podem ser visualizadas na Figura 27. Aproximadamente 73% dos participantes eram do sexo feminino, 23% do sexo masculino, dentre esses 74% eram da faixa etária entre 17 – 25 anos. Essa diferença ocorreu porque a análise foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da FZEA/USP, que é frequentado predominantemente por estudantes do curso de Engenharia de Alimentos, que é constituído majoritariamente por mulheres jovens. Apenas 29% dos provadores preferem chocolate meio amargo, enquanto o chocolate ao leite apresenta a maior porcentagem de preferência (51%). Inicialmente esses dados foram preocupantes já que o consumidor de chocolate ao leite está acostumado com uma matriz alimentícia mais adocicada e com menor concentração de sólidos do cacau, entretanto, apenas provadores que já experimentaram anteriormente chocolate meio amargo puderam avaliar os produtos. Esse quesito foi pré-estabelecido com a finalidade de evitar a confusão entre preferência e aceitação.

A frequência do consumo de chocolate foi considerada elevada, 23% dos provadores consomem chocolate diariamente, enquanto a maioria (56%) consome semanalmente. O consumo regular do chocolate por alguns provadores pode influenciar nas notas dadas, porque esse tipo de consumidor será mais crítico aos produtos apresentados.

Em relação ao consumo de alimentos funcionais, aproximadamente 40% dos provadores afirmaram que consomem esses produtos; 41% alegaram que consomem, entretanto, acham os preços elevados e 18% consomem alimentos funcionais, mas reclamam da falta opções no supermercado. Para os provadores, os aspectos decisivos predominantemente para a compra desse tipo de alimento são: 25% o preço, 21% o sabor, 11% a marca e 10% a tradição. Essas últimas respostas demonstram o interesse do consumidor em uma alimentação mais equilibrada, buscando alimentos funcionais, mas ao

mesmo tempo a dificuldade de encontrar produtos de diferentes categorias no supermercado. Dessa forma, o chocolate seria uma possibilidade de diversificação dos produtos probióticos já comercializados, que na sua grande maioria são de origem láctea. Além disso, muitos consumidores apresentam restrições alimentares, como os intolerantes à lactose e os alérgicos as proteínas do leite, sendo que o chocolate elaborado não apresentou em sua composição nenhum derivado lácteo.

Figura 27 – Perfil de preferências dos provadores das amostras de chocolate meio amargo. As porcentagens em cada quesito são referentes às respostas dadas pelos provadores em relação ao número total de participantes.

Fonte: Própria autoria.

As amostras de chocolate meio amargo foram avaliadas por 100 provadores, os quais foram questionados quanto à cor, sabor, aroma, textura e aceitação global. Os resultados são apresentados na Tabela 17 e Figura 27. De acordo com os resultados, não houve diferença significativa em todas as formulações em relação ao aroma, textura e aceitação, indicando que a adição de probióticos na forma livre ou encapsulada não influenciou nesses parâmetros. Entretanto, a amostra 3 (adicionada de MSL contendo *L. acidophilus*) apresentou as menores

notas em relação a cor e sabor. Provavelmente, o provador verificou a presença das MSL na amostra de chocolate, mas considerando a escala hedônica, a nota “7” é designada como “gostei regularmente”. Apesar da nota um pouco inferior comparada às outras amostras, as MSL apresentam potencial para aplicação em chocolate.

Se a viabilidade dos probióticos encapsulados fosse superior não seria necessário acrescentar aproximadamente 10 g de MSL probióticas a cada 100 g de amostra de chocolate, portanto, esse é um critério a ser melhorado em futuros estudos. A escala hedônica utilizada pelos provadores para avaliar as amostras variou entre 1 – 9, onde “1” significou “desgostei extremamente”, enquanto “9” se referiu “gostei extremamente”, e a menor nota foi $7,08 \pm 1,24$, o que permitiu inferir que todos os produtos foram bem aceitos. Todas as formulações apresentaram aceitação global acima de 7,18.

Tabela 17 – Médias e desvio padrão dos atributos avaliados nas amostras de chocolate meio amargo probiótico. As notas foram dadas utilizando a escala hedônica de 9 pontos.

Amostra	Aroma	Cor	Textura	Sabor	Aceitação
1	$7,39 \pm 1,13^a$	$8,01 \pm 0,96^a$	$7,31 \pm 1,45^a$	$7,67 \pm 1,04^a$	$7,59 \pm 1,02^a$
2	$7,30 \pm 1,26^a$	$7,91 \pm 0,98^a$	$7,36 \pm 1,34^a$	$7,53 \pm 1,32^{ab}$	$7,56 \pm 1,16^a$
3	$7,15 \pm 1,28^a$	$7,27 \pm 1,45^b$	$7,11 \pm 1,33^a$	$7,08 \pm 1,24^b$	$7,18 \pm 1,12^a$
4	$7,28 \pm 1,38^a$	$7,93 \pm 1,15^a$	$7,36 \pm 1,46^a$	$7,76 \pm 1,23^a$	$7,57 \pm 1,19^a$
5	$7,35 \pm 1,30^a$	$7,65 \pm 1,30^{ab}$	$7,39 \pm 1,52^a$	$7,15 \pm 1,46^b$	$7,26 \pm 1,34^a$

Médias dos atributos seguidas de letra minúscula iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nessa Tabela: **1** – chocolate controle (sem probióticos), **2** – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, **3** – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, **4** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e **5** – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

Na Figura 28 é possível visualizar no gráfico radar as médias atribuídas pelos provadores para as amostras de chocolate. As intersecções das linhas no gráfico, que representam cada amostra de chocolate, demonstram que as médias foram equilibradas para cada parâmetro avaliado.

Figura 28 – Médias dos parâmetros avaliados nas amostras de chocolate meio amargo probiótico.

Amostra 1 – Controle, amostra 2 – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, amostra 3 – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, amostra 4 – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e amostra 5 – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

A Figura 29 apresenta a intenção de compra das amostras de chocolate. Pelo menos 75% dos provadores comparariam os produtos se estivessem disponíveis no mercado. A amostra 5 (chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado) foi a mais rejeitada pelos provadores, sendo que 10%, ou seja 10 provadores, responderam que não comprariam aquele produto. Entre os motivos descritos por esses provadores que negaram a amostra 5, pode-se citar o sabor amargo e a textura. Entretanto, estratificando o perfil de consumo desses provadores, 8 deles são consumidores de chocolate ao leite e 1 deles consumidor de chocolate branco, o que pode ter levado a comparação com as sensações que têm ao consumir o chocolate ao leite e branco, ocasionando a negação do produto. Por outro lado, a maior porcentagem de dúvida na intenção de compra foi em relação à amostra 3 (chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*), aproximadamente 20% dos provadores responderam que talvez comprariam o produto. Dentre esses 20 provadores, 15 são consumidores de chocolate ao leite e 3 são provadores de chocolate branco. Novamente essas preferências pessoais podem ter impactado na decisão dos provadores. Entretanto, os produtos apresentaram excelente intenção de compra mesmo apresentando as MSL probióticas (amostras 3 e 5).

Figura 29 – Intenção de compra das amostras de chocolate.

Amostra 1 – Controle, amostra 2 – chocolate adicionado de *L. acidophilus* livre, amostra 3 – chocolate adicionado de MSL de *L. acidophilus*, amostra 4 – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* livre e amostra 5 – chocolate adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* encapsulado. Fonte: Própria autoria.

Resultados similares foram obtidos por Kemsawasd, Chaikham e Rattanasena (2016), que desenvolveram amostras de chocolate amargo, ao leite e branco adicionados de probióticos encapsulados por spray drying. As amostras foram avaliadas por 50 provadores, obtendo como a menor nota de aceitação 7,2 para o chocolate amargo, considerando que as

notas foram atribuídas de acordo com a escala hedônica de 9 pontos. Por outro lado, Erdem et al. (2014) produziram e caracterizaram amostras de chocolate amargo contendo *Bacillus indicus* HU36 e fibras dietéticas. A amostra controle apresentou como média de aceitação 8,5 na escala hedônica de 9 pontos. Entretanto, as amostras de chocolate contendo as fibras não foram tão bem aceitas, sendo a pior média de aceitação de 1,2 para a amostra contendo carboximetilcelulose (CMC). O acréscimo de ingredientes não usuais no chocolate deve ter impactado na avaliação sensorial. No presente projeto, algumas fichas de avaliação dos provadores apresentaram como comentários a observação das micropartículas probióticas no chocolate, porém essas amostras foram tão bem aceitas quanto às demais. Portanto, as amostras de chocolate meio amargo acrescentadas dos probióticos na forma livre e encapsulada apresentaram grande aceitação do público.

6 Conclusões

As partículas produzidas pelos dois métodos – *spray chilling* ou recobertos por interação eletrostática – protegeram os probióticos em condições gastrointestinais simuladas, quando comparadas com os probióticos livres. Provavelmente a gordura vegetal presente em ambas as estruturas protegeu as populações dos probióticos durante o ensaio *in vitro* da passagem pelo trato gastrointestinal. Entretanto, os probióticos encapsulados por *spray chilling* em fluidos gastrointestinais simulados apresentaram contagens superiores aos mesmos micro-organismos recobertos por interação eletrostática, o que justifica a aplicação apenas das micropartículas obtidas por *spray chilling* no chocolate meio amargo.

Em relação à matriz alimentícia estudada, o chocolate meio amargo protegeu os micro-organismos probióticos durante a estocagem de 120 dias a 25 °C, sendo que as amostras acrescentadas dos micro-organismos na forma livre apresentaram entre 84 – 92% das células viáveis ao final do período, enquanto as amostras adicionadas das micropartículas probióticas apresentaram contagens abaixo do limite de detecção da análise ($< 2 \log \text{ UFC/g}$). Além disso, foi observado ao final da análise da sobrevivência dos probióticos aos fluidos gastrointestinais simulados pelo menos 83% das células viáveis em chocolate meio amargo, demonstrando seu potencial para incorporação de compostos bioativos. As populações de probióticos não encapsulados se mantiveram durante o ensaio, porque as características físico químicas do chocolate, como pH, atividade de água, teor de gordura e compostos fenólicos propiciaram um ambiente de manutenção das células probióticas, que em contrapartida não alteraram alguns parâmetros essenciais para o consumo do produto, como o sabor, aroma e textura. Nesse sentido, os compostos fenólicos presentes no chocolate podem ter reduzido o stress oxidativo das células, prolongando a viabilidade dos probióticos nas amostras. Entretanto, os probióticos encapsulados provavelmente não foram influenciados pela presença desses compostos, pois os micro-organismos estavam envolvidos na matriz carreadora, o que pode ser outra justificativa para a redução da viabilidade durante a estocagem. Além disso, as amostras de chocolate foram bem aceitas pelo grupo de cem provadores, obtendo notas acima de 7 na escala hedônica de 9 pontos. Portanto, considerando a boa aceitação desses produtos, a manutenção da viabilidade dos probióticos na matriz alimentícia, o efeito antioxidante pela presença dos compostos fenólicos no chocolate meio amargo, esses resultados indicam o potencial desses produtos para a diversificação dos alimentos probióticos disponíveis no mercado. Porém, vale ressaltar que é um produto que apresenta alto teor de lipídios, e o seu consumo deve seguir as recomendações diárias de aproximadamente 20 g – 30 g.

7 Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se a aplicação do probiótico liofilizado no carreador, ao invés de utilizar a suspensão aquosa.

Trabalhar com altas concentrações iniciais de probióticos para encapsulação, o que impactará em uma menor quantidade de partículas a serem adicionadas nos alimentos.

Estudar se os métodos de encapsulação afetam a funcionalidade dos probióticos, por meio de análises *in vivo*.

Avaliar a interação dos compostos fenólicos presentes no chocolate e os probióticos.

Investigar a cinética de liberação dos probióticos encapsulados.

REFERÊNCIAS

- ADAMI, A. A. V. **Estudo *in vitro* do comportamento simbiótico de linhagens probióticas na presença de oligossacarídeos**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- ADAMSON, G. E. et al. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 4184-4188, 1999.
- AFOAKWA, E. O. et al. Influence of tempering and fat crystallization behaviours on microstructural and melting properties in dark chocolate systems. **Food Research International**, Kidlington, v. 42, p. 200-209, 2009.
- AFOAKWA, E. O. et al. Relationship between rheological, textural and melting properties of dark chocolate as influenced by particle size distribution and composition. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 227, p. 1215-1223, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- _____. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 dez. 2000. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 12 mai. 2016.
- _____. Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para chocolate e produtos de cacau. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 jan. 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_264_2005.pdf/7a0256b4-79e1-4a5a-8129-7f37ba6f2cd7>. Acesso em: 17 mai. 2016.
- _____. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 jan. 2002.
- ALANÓN, M. E. et al. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 208, p. 177-184, 2016.
- ALBADRAN, H. A. et al. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. **Food Research International**, Kidlington, v. 74, p. 208-216, 2015.

ALBERTINI, B. et al. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 69, p. 348-357, 2008.

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por *spray drying* e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. 2005. 243 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, p. 1069-1076, 2010.

ALVES, N. N. et al. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **Journal of Food Engineering**, London, v. 189, p. 45-54, 2016.

ANDREWS, W. H. et al. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 357-380.

BAMPI, G. B. et al. Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 9, p. 1422-1428, 2016.

BARBOSA, F. H.; BARBOSA, L. P. J. L.; NICOLI, J. R. Avaliação da capacidade probiótica de uma linhagem de *Ruminococcus gnavus* da microbiota fecal de seres humanos contra *Clostridium perfringens*. **Estação Científica UNIVAP**, Macapá, v.1, p 75-88, 2011.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. Encapsulation processes. IN: BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. **Food powders: physical properties, processing, and functionality**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. cap. 8, p. 199-218.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 143, p. 325-345, 1981.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. New York: Wiley-Blackwell, 2009. 669 p.

BEGOT, C. et al. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 25, p. 225-232, 1996.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 3, p. 76-129.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 61, p. 160-174, 2012.

- BERNINI, L. J. et al. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: a randomized trial: effects of probiotics on metabolic syndrome. **Nutrition**, New York, v. 32, p. 716-719, 2016.
- BEZERRA, M. et al. Caprine frozen yoghurt produced with fresh and spray dried jambolan fruit pulp (*Eugenia jambolana* Lam) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-07. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 62, p. 1099-1104, 2015.
- BIALONSKA, D. et al. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 175 -182, 2010.
- BISPO, E. S.; GUIMARÃES, A. G.; MIRANDA, M. S. Cacau e Café e a aplicação de probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Varela, 2011, v. 1, p. 1-672.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOSNEA, L. A.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 7, p. 2767-2781, 2014.
- BUIJSSE, B. et al. Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. **European Heart Journal**, Oxford, v. 31, p. 1616-1623, 2010.
- BUSTAMANTE, M. et al. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 216, p. 97-105, 2017.
- CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 149, p. 185-193, 2011.
- CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 184-190, 2007.
- CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L. Prato cheese as suitable carrier for *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium* Bb12. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 52, p. 10-18, 2016.
- CHOTIKO, A.; SATHIVEL, S. Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-bran-extract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 66, p. 420-427, 2016.

- COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M. N. H. Revisão: temperagem ou pré cristalização do chocolate. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, p. 23-30, 2004.
- COMUNIAN, T. A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: protection and controlled release. **Food Research International**, Kidlington, v. 52, p. 373-379, 2013.
- COMUNIAN, T. A. et al. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 442-457, 2016.
- COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 162, p. 56-57, 2012.
- COSTA, G. M. et al. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 75, p. 195-201, 2017.
- CRUXEN, C. E. S. et al. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of during storage. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 75, p. 379-385, 2017.
- CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, Kidlington, v. 40, p. 951-956, 2007.
- CUEVA, C. et al. *In vitro* fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 83, p. 792-805, 2013.
- CURIEL, A. J.; MUNOZ, R.; LOPEZ DE FELIPE, F. pH and dose-dependent effects of quercetin on the fermentation capacity of *Lactobacillus plantarum*. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 43, p. 926-933, 2010.
- DEMERS-MATHIEU, V. et al. Effect of the low-fat Cheddar cheese manufacturing process on the viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei/casei*, and *Lactobacillus plantarum* isolates. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 24, p. 327-337, 2016.
- DEPYPERE, F. et al. Triacylglycerol migration and bloom in filled chocolates: Effects of low-temperatures storage. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, p. 280-289, 2009.
- ERATTE, D. et al. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 19, p. 882-892, 2015.
- ERDEM, O. et al. Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 56, p. 187-193, 2014.

FÁVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulação de probióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Varela, 2011, v. 1, p. 239-254.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 19, p. 485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 55, p. 496-499, 2000.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; HEINEMANN, R. J. B.; PEDROSO, D. L. Review: developments in probiotic encapsulation. **CABI Review: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Wallingford, v. 6, p. 1-8, 2011.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, p. 103-112, 2008.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; OKURO, P. K.; MATOS JR, F. E. Encapsulation via spray chilling/cooling/congealing. In: MISHRA, M. K. (Ed.). **Handbook of encapsulation and controlled release**. Boca Raton: CRC Press, 2015, p. 71-88.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, Kidlington, v. 16, p. 284-292, 2013.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 15 maio 2015.

FOONG, Y. J. et al. Incorporation of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented cocoa beans into dark chocolate: bacterial viability and physicochemical properties analysis. **Journal of Food Quality**, Hoboken, v. 36, p. 164-171, 2013.

GADHIYA, D.; PATEL, A.; PRAJAPATI, J. B. Current trend and future prospective of functional probiotic milk chocolates and related products – a review. **Czech Journal Food Sciences**, Prague, v. 33, p. 295-301, 2015.

GAUDREAU, H. et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells and green tea extract: Influence on cell survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 26, p. 451-459, 2016.

GBASSI, G. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 103-105, 2009.

GEBARA, C. et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, Kidlington, v. 51, p. 872-878, 2013.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, v. 161, p. 480-487, 2010.

GIUSEPPE, R. et al. Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-Reactive protein in a healthy Italian population. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 138, p. 1939-1945, 2008.

GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 10, p. 139-157, 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 15, p. 330-347, 2004.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 151-156, 2004.

GRUNENVALDT, F. L. **Avaliação de propriedades físicas e sensoriais e do desempenho tecnológico de chocolates produzidos com misturas de manteiga de cacau e gorduras low/zero trans**. 2009. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, a Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

GULTEKIN-OZGUVEN, M.; BERKTAS, I.; OZÇELIK, B. Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 72, p. 559-565, 2016.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 11, p. 506-514, 2014.

IZURIETA, W. P.; KOMITOPOULOU, E. Effect of moisture on *salmonella* spp. heat resistance in cocoa and hazelnut shells. **Food Research International**, Kidlington, v. 45, p. 1087-1092, 2012.

JIMÉNEZ, M. et al. Effect of water activity on the stability of *Lactobacillus paracasei* capsules. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, p. 346-351, 2015.

KAMPHUIS, H. J. Production and quality standards of cocoa mass, cocoa butter and cocoa powder. In: BECKETT, S. T. (Ed.). **Industrial chocolate manufacture and use**. New York: Wiley-Blackwell, 2009. p. 121 -142.

KEENAN, T. R. Gelatin. In: WISEMAN, M.; KOST, J.; DOMB, A. J. (Eds.). **Handbook of biodegradable polymers**. Boca Raton: CRC Press, 1998.

KEMSAWASD, V.; CHAIKHAM, P.; RATTANASENA, P. Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 16, p. 37-43, 2016.

KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E.E. Probiotic and gut *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*: molecular approaches to study diversity and activity. **The Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 269-290, 2009.

KLINDT-TOLDAM, S. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 encapsulated in chocolate during in vitro simulated passage of the upper gastrointestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 74, p. 404-410, 2016.

KLU, Y. A. K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 62, p. 983-988, 2015.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 69-82.

KRULWICH, T. A.; SACHS, G.; PADAN, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 330-343, 2011.

LALICIC-PETRONIJEVIC, J. et al. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 15, p. 541-550, 2015.

LAHTINEN, S. J. et al. Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. **Letters in applied Microbiology**, Chichester, v. 44, p. 500-505, 2007.

LAHTINEN, S. J. et al. Probiotic bacteria may become dormant during storage. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1662-663, 2005.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 6, p. 241-245, 2009.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. M. G. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, New York, v. 21, p. 1-16, 2007.

LOHMAN, M.; HARTEL, R. Effect of milk fat fractions on fat bloom in dark chocolate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 71, p. 267-276, 1994.

LOPES, J. D. **Produção e caracterização de micropartículas sólidas lipídicas, obtidas por spray cooling, para utilização como agentes de nucleação na produção de chocolates**. 2015. 172 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2015.

LUCCAS, V.; BONOMI, E. C.; KIECKBUSCH, T. G. Comparative characterization between milk chocolates formulated with anhydrous milk fat and with milk fat stearin. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 17, p. 130-138, 2014.

LUCCAS, V.; KIECKBUSCH, T. G. Comparative study of the polymorphism of cupuassu fat and cocoa butter using differential scanning Calorimetry. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, p. 63-68, 2006.

MADUREIRA, A.R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, Kidlington, v. 44, p.465-470, 2011.

MAILLARD, M.; LANDUYT, A. Chocolate: an ideal carrier for probiotics. **Agro Food Industry Hi-Tec**, Milan, v. 19, p. 13-15, 2008.

MANDAL, S. et al. Development of symbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 37, p. 1031-1037, 2013.

MARINHO, J. F. U. **Desenvolvimento e avaliação de sorbets probióticos e simbióticos elaborados com polpa de juçara (*Euterpe edulis*)**. 2016. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

MATIAS, N. S. et al. In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 234, p. 83-93, 2016.

MATOS JR, F. E. et al. Effect of feed preparation on the properties and stability of ascorbic acid microparticles produced by spray chilling. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 75, p. 251-260, 2017.

MAUKONEN, J.; SAARELA, M. Human gut microbiota: does diet matter? **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 74, p. 23-36, 2015.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 1999. 390 p.

MEIRA, Q. G. S. et al. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated

gastrointestinal conditions. **Food Research International**, Kidlington, v. 76, p. 828-838, 2015.

MILLER, K. B. et al. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 4062-4068, 2006.

MOKHTARI, S.; JAFARI, S. M.; KHOMEIRI, M. The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel wall material for encapsulation of probiotics. **Food Research International**, 2016. In press.

NEBESNY, E. et al. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 225, p. 33-42, 2007.

OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 24, p. 685-693, 2007a.

OLIVEIRA, A. C. et al. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. **Drying Technology**, New York, v. 25, p. 1687-1693, 2007b.

OKURO, P. K. **Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas produzidas por spray chilling**. 2013. 200 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

OKURO, P. K. et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, Kidlington, v. 53, p. 96-103, 2013.

OKURO, P. K.; MATOS JR, F. E.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 51, p. 171-182, 2013.

ORIANI, V. B. et al. Solid lipid microparticles produced by spray chilling technique to deliver ginger oleoresin: Structure and compound retention. **Food Research International**, Kidlington, v. 80, p. 41-49, 2016.

OZOGUL, F.; HAMED, I. Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Reference Module in Food Science**, 2016.

PÁEZ, R. et al. Study of effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli. **International Journal of Dairy Technology**, Chichester, v. 66, p. 155-161, 2013.

PAUCAR, O. C. et al. Production by spray chilling and characterization of solid lipid microparticles loaded with vitamin D₃. **Food and Bioproducts Processing**, 2016. In press.

PEDROSO, D. L. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 777-783, 2013.

- PEDROSO, D. L. et al. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 26, p. 127-132, 2012.
- PELISSARI, J. R. et al. Production of solid lipid microparticles loaded with lycopene by spray chilling: Structural characteristics of particles and lycopene stability. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 98, p. 86-94, 2016.
- PELLETIER, C. et al. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1725-1731, 1997.
- PEREIRA, A. L. F. et al. Storage stability and acceptance of probiotic beverage from cashew apple juice. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, p. 3155-3165, 2013.
- PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T.C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, Kidlington, v. 44, p. 1276-1283, 2011.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 14, p. 505-515, 2004.
- PODDAR, D. et al. Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by drying method. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 39, p. 1-7, 2014.
- POSSEMIERS, S. et al. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. 97-103, 2010.
- QUAST, L. B. et al. Influência da incorporação de gordura de cupuaçu na temperagem da manteiga de cacau. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, p. 130-136, 2007.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, Kidlington, v. 43, p. 1-7, 2010.
- REOLON, E. M. et al. Pesquisa de enterobactérias em chocolate. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, p. 40-43, 2012.
- ROCHA-SELMÍ, G. et al. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. **Journal of Food Engineering**, London, v. 119, p. 28-32, 2013.
- ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 9, p. 29-33, 1980.
- SAAD, S. M. I. Probiótico e prebiótico: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, p. 1-16, 2006.

SANTOS, M. G. et al. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 171, p. 32-39, 2015.

SELMA, M. V.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 6485-6501, 2009.

SHOJI, A. S. et al. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 91, p. 83-88, 2013.

SILVA, M. P. et al. Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 75, p. 640-647, 2017.

SILVA, M. P. et al. Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes. **Food Research International**, Kidlington, v. 89, p. 582-590, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, Maryland Heights, v. 299, p. 152-178, 1999.

SONWAI, S.; ROUSSEAU D. Controlling fat bloom formation in chocolate – impact of milk fat on microstructure and fat phase crystallisation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 119, p. 286-297, 2010.

SOUSA, S. et al. Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 93, p. 90-97, 2015.

SOUZA, V. B. et al. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 164, p. 380-386, 2014.

SUNNY-ROBERTS, E. O.; KNORR, D. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. **Food Microbiology**, London, v. 25, p. 183-189, 2008.

TALBOT, G. Chocolate temper. In: BECKETT, S. T. (Ed.) **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. New York: Wiley-Blackwell, 2009. p. 261-275.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 9, p. 225-241, 2014.

TULINI, F. L. et al. Development of solid lipid microparticles loaded with a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*): Potential for increasing

antioxidant content in functional foods for diabetic population. **Food Research International**, Kidlington, v. 85, p. 10-18, 2016.

TZOUNIS, X. et al. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 93, p. 62-72, 2011.

VALDÉS, L. et al. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. **Food & Function**, Cambridge, v. 6, p. 2424-2439, 2015.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 157, p. 319-321, 2012.

VINDEROLA, G. et al. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, art. 70, 2011.

VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 20, p. 292-302, 2010.

WANG, L. Q. et al. Live/dead state is not the factor influencing adhesion ability of *Bifidobacterium animalis* KLDS2.0603. **Journal of Microbiology**, Korea, v. 51, p. 584-589, 2013.

WANG, S. Y. et al. Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus kefiranoferiens* M1. **Food Microbiology**, London, v. 46, p. 494-500, 2015.

WERBER, D. et al. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. **BMC Infect Diseases**, London, v. 5, p. 7-17, 2005.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. (Eds.). **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York: Springer, 2010.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa “Avaliação sensorial de chocolate meio amargo probiótico”.

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

Justificativa: Pretende-se avaliar a aplicação das microcápsulas probióticas obtidas por spray chilling em chocolate meio amargo. A microencapsulação tem por objetivo proteger as bactérias probióticas durante o processamento, estocagem e na passagem pelo trato gastrointestinal, já que os micro-organismos são sensíveis a meios ácidos e temperaturas elevadas. O chocolate foi escolhido por ser um produto muito apreciado por consumidores de todas as faixas etárias, além disso, não temos no mercado brasileiro um produto similar, sendo uma possibilidade de diversificação dos produtos probióticos comercializados. O estudo da aceitação através da análise sensorial se torna de suma importância para o sucesso na produção de novos produtos.

Objetivos do projeto: O objetivo do projeto é avaliar a aceitação sensorial do chocolate meio amargo adicionado dos micro-organismos probióticos na forma livre e encapsulada.

Procedimentos: A análise sensorial avalia diversos atributos de qualidade de alimentos. Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão os seguintes:

- Cem provadores farão a avaliação sensorial dos produtos;
- Serão testadas formulações de chocolate meio amargo de diferentes composições;
- O provador deverá avaliar os produtos e responder às perguntas solicitadas na Ficha de Avaliação;
- A duração do teste para cada pessoa será de aproximadamente 10 minutos.

Outras informações:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado;
- Os provadores não terão qualquer tipo de despesas em decorrência da participação nesta pesquisa;
- Não há possibilidade de risco ou qualquer tipo de desconto em função da participação nesta pesquisa, uma vez que todos os ingredientes utilizados nos produtos são inteiramente seguros, boa qualidade e procedência. O processo de fabricação dos chocolates será realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação;
- Em função do exposto no item anterior, não há previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto;

- Os testes para avaliação sensorial dos chocolates probióticos, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos, serão acompanhados pela aluna preponente (Marluci Palazzolli da Silva);
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____ RG: _____,
CPF: _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Avaliação sensorial de chocolate meio amargo adicionado de micro-organismos na forma livre e encapsulada”.

Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto a identidade da minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo, assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores.

Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Aluna de Pós Graduação responsável: Marluci Palazzolli da Silva – Engenheira de Alimentos – FZEA – USP. Contatos: marluci.silva@usp.br / (18) 99712-2985.

Pirassununga, _____ de _____ de 2015.

Assinatura: _____

APÊNDICE B – Questionário de consumo

Nome: _____

Questionário de Consumo

Temos diversos tipos de chocolates nas prateleiras dos supermercados, atendendo as preferências de cada consumidor. Como parte de uma pesquisa de mestrado que envolve o desenvolvimento de chocolate probiótico, gostaríamos de conhecer você, sua opinião e preferência de consumo.

- 1) Faixa etária: () 17-25 () 26-35 () 36-45 () 46-50 () acima de 50
- 2) Você prefere qual tipo de chocolate?
() Amargo () Meio amargo () Ao leite () Branco () Nenhum
- 3) Com qual frequência você consome chocolate?
() Diariamente
() Semanalmente
() Ocasionalmente
() Raramente
- 4) Você costuma consumir alimentos funcionais, ou seja, alimentos que contenham ingredientes que são benéficos à saúde?
() Sim
() Sim, mas faltam opções no supermercado
() Sim, mas não com muita frequência pelo custo
() Não, porque: _____
- 5) Cite pelo menos três aspectos que você considere importante para comprar chocolate? (Ex: tradição, preço, etc.).

- 6) Se fosse possível aliar benefícios à saúde por meio do consumo de chocolate, você estaria disposto a consumir esse produto?
() Sim
() Não, porque: _____

Obrigada!

APÊNDICE C – Ficha de avaliação das amostras de chocolate

Nome: _____ Data: ____/____/____ Ficha: ____

Você está recebendo uma amostra de **CHOCOLATE MEIO AMARGO**. Por favor, avalie o produto e marque na escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:

Número da Amostra: _____

	Aspecto	Nota	Comentários
Escala	AROMA		
1 – Desgostei muitíssimo	COR		
2 – Desgostei muito			
3 – Desgostei moderadamente			
4 – Desgostei ligeiramente	TEXTURA		
5 – Nem gostei/Nem desgostei	SABOR		
6 – Gostei ligeiramente			
7 – Gostei regularmente			
8 – Gostei muito	ACEITABILIDADE		
9 – Gostei muitíssimo	GERAL		

Você compraria esse produto?

() Sim

() Talvez

() Não, porque: _____

APÊNDICE D – Apresentação de trabalhos durante o mestrado

Os resultados do mestrado geraram trabalhos que foram apresentados em alguns eventos científicos durante o período:

- **SILVA, M.P.**; Marinho, J.F.U.; Thomazini, M.; Fávaro-Trindade, C.S. Avaliação e aplicação de micropartículas sólidas lipídicas de *Lactobacillus acidophilus* em chocolate meio amargo. **VII Simpósio de Microbiologia Aplicada**, 2015, Rio Claro, Brasil.
- **SILVA, M.P.**; Tulini, F.L.; Matos Jr., F.E.; Fávaro-Trindade, C.S. Probiotic microparticles obtained by spray chilling and complex coacervation. **23th International Conference on Bioencapsulation**, 2015, Delft, Holanda.
- **SILVA, M.P.**; Mazzocato, M.C.; Tulini, F.L.; Marinho, J.F.U.; Thomazini, M.; Fávaro-Trindade, C.S. *In vitro* evaluation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* survival in simulated gastrointestinal fluids after application in semisweet chocolate. **8th Probiotics, Prebiotics & New Foods**, 2015, Roma, Itália.
- **SILVA, M.P.**; Tulini, F.L.; Fávaro-Trindade, C.S.; Poncelet, D. Avaliação da encapsulação por co-extrusão de *Lactobacillus paracasei* seguida por secagem em leite fluidizado e liofilização. **International Workshop on Advances of Probiotics for Food and Veterinary Applications**, 2016, Campinas, Brasil.
- Poncelet, D.; **SILVA, M.P.**; Ribas, M.M.; Penning, M.; Fávaro-Trindade, C.S. Probiotic microcapsules obtained by co-extrusion followed by drying. **24th International Conference on Bioencapsulation**, 2016, Lisboa, Portugal.
- **SILVA, M.P.**; Holkem, A.T.; Thomazini, M.; Fávaro-Trindade, C.S. Production and characterization of solid lipid microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. **1st Workshop of Bioactive Compounds: from food science to human nutrition**, 2016, Campinas, Brasil.

ANEXO I – Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa para a avaliação das amostras de chocolate probiótico.

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA USP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Avaliação sensorial de chocolate meio amargo adicionado de micro-organismos probióticos		
Pesquisador: Marlucci Palazzolli da Silva		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 35269214.0.0000.5422		
Instituição Proponente: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 796.514		
Data da Relatoria: 17/09/2014		
Apresentação do Projeto:		
O projeto está bem elaborado, com objetivos definidos e metodologia adequada. Será produzido chocolate com a adição de probióticos encapsulados, verificando sua estabilidade e aceitação sensorial.		
Objetivo da Pesquisa:		
O objetivo deste projeto é elaborar chocolates acrescidos dos probióticos na forma livre e encapsulada pelo método spray chilling, e caracterizar sensorialmente os produtos obtidos.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
O uso de probióticos na alimentação humana pode gerar benefícios de ordem terapêutica ao reduzir o colesterol, melhorar a tolerância à lactose e impedir o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Apenas haveriam riscos em pessoas alérgicas ou intolerantes às substâncias utilizadas na elaboração do chocolate.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
A pesquisa pode trazer contribuição positiva na área de saúde, pois já são conhecidos os benefícios dos probióticos à saúde do homem.		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
O Termo de consentimento livre e esclarecido foi apresentado e será necessário sua assinatura		
Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225		
Bairro: Campus Universitário da USP CEP: 13.635-900		
UF: SP Município: PIRASSUNUNGA		
Telefone: (19)3565-4299 Fax: (19)3565-4114 E-mail: apoiofzea@usp.br		

Página 01 de 02

FACULDADE DE ZOOTECNIA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA USP

Continuação do Parecer: 796.514

para a participação na pesquisa.

Recomendações:

Recomendamos a aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências no projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP-FZEA aprova a pesquisa por unanimidade de votos.

PIRASSUNUNGA, 18 de Setembro de 2014

Assinado por:
Daniele dos Santos Martins
(Coordenador)

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225
Bairro: Campus Universitário da USP CEP: 13.635-900
UF: SP Município: PIRASSUNUNGA
Telefone: (19)3565-4299 Fax: (19)3565-4114 E-mail: apoiofzea@usp.br

Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

Marluci P. Silva^a, Fabricio L. Tulini^a, Júlia F.U. Marinho^a, Marcella C. Mazzocato^a, Elaine C.P. De Martinis^b, Valdecir Luccas^c, Carmen S. Favaro-Trindade^{a,*}

^a Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^c Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolates (CEREAL CHOCOTEC), Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2016

Received in revised form

2 August 2016

Accepted 8 October 2016

Available online 11 October 2016

Keywords:

Viability

Cocoa

Phenolics

Sensorial acceptance

Hardness

ABSTRACT

Semisweet chocolate pleases a broad range of consumers, but it is an underexplored food matrix among probiotic products. Thus, this study aimed to evaluate semisweet chocolate as a vehicle for probiotics (*Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1). The chocolates were evaluated by a_w , pH, surface color and morphology, hardness, microbiological quality, sensorial acceptance and probiotic viability. Besides, probiotic survival in simulated gastric and intestinal fluids (SGF/SIF) was evaluated before and after application in chocolate. Samples presented pH values around 6 and a_w below 0.6. Free probiotics populations were reduced after exposure to SGF/SIF, while no significant reduction was detected in probiotic populations incorporated into chocolate. After 120 days of storage at 25 °C, probiotic populations in chocolate were reduced by only 1.4 and 0.7 logarithmic cycles, respectively. Considering these results and that all samples were very well accepted by panelists, semisweet chocolate can be considered a good vehicle for probiotics.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization (FAO) define probiotics as “live microorganisms that when administered in adequate amounts confer health benefits to the host” (Food and Agriculture Organization & World Health Organization, 2002). However, probiotics have to survive to food processing and throughout the gastrointestinal tract, challenging the food industry to find new alternatives for incorporating these microorganisms in food. Several parameters such as high temperatures, pH variation and oxygen may affect probiotic survival (Favaro-Trindade, Heinemann, & Pedroso, 2011; Tripathi & Giri, 2014).

Probiotic functionality may be enhanced when these microorganisms are incorporated in food, since interaction with food ingredients can protect microbial cells during the passage through the gastrointestinal tract (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010; Vinderola, Binetti, Burns, & Reinheimer, 2011). In this context, dairy products are considered a good vehicle for probiotics, and they have been widely used by the food industry. However, part of the world population do not consume those products due to lactose intolerance, milk allergy or even due to diets that restrict the use of animal protein. To overcome this problem, semisweet chocolate may be an alternative to dairy products. Furthermore, chocolate has other beneficial properties such as recognized antioxidant activity (Gadhiya, Patel, & Prajapati, 2015). Moreover, phenolic compounds in chocolate may also play an important role in delaying oxidative stress in probiotics, which is one of the main causes of probiotic death in food, leading to improved viability and extended shelf life (Bialonska et al., 2010; Curiel, Munoz, & Lopez de Felipe, 2010; Pereira, Almeida, de Jesus, da Costa, & Rodrigues, 2013). According to Gadkari and Balaraman (2015), chocolate is a potential source

* Corresponding author. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Avenida Duque de Caxias Norte, 225, 13635-000 Pirassununga, São Paulo, Brazil.

E-mail address: carmenf@usp.br (C.S. Favaro-Trindade).

Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes

Marluci P. Silva^{a,b,*}, Fabricio L. Tulini^a, Marcela M. Ribas^b, Manfred Penning^c,
Carmen S. Fávoro-Trindade^a, Denis Poncelet^b

^a Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil

^b Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation de Nantes-Atlantique (ONIRIS), Nantes, France

^c PennConsult, Mainz, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2016

Received in revised form 2 September 2016

Accepted 3 September 2016

Available online 7 September 2016

Keywords:

Coconut fat
sunflower oil
fluidized bed drying
lyophilization
viability
encapsulation

ABSTRACT

Microcapsules containing *Lactobacillus paracasei* BGP-1 were produced by co-extrusion technology using alginate and alginate-shellac blend as wall materials. Sunflower oil and coconut fat were used as vehicles to incorporate BGP-1 into the microcapsules. The microcapsules were evaluated with regard the particle size, morphology, water activity and survival of probiotics after 60 days of storage at room temperature. Fluidized bed and lyophilization were used to dry the microcapsules and the effect of these processes on probiotic viability was also evaluated. Next, dried microcapsules were exposed to simulated gastrointestinal fluids to verify the survival of BGP-1. Microcapsules dried by fluidized bed had spherical shape and robust structures, whereas lyophilized microcapsules had porous and fragile structures. Dried microcapsules presented a medium size of 0.71–0.86 mm and a_w ranging from 0.14 to 0.36, depending on the drying process. When comparing the effects of drying processes on BGP-1 viability, the fluidized bed was less aggressive than lyophilization. The alginate-shellac blend combined with coconut fat as core effectively protected the encapsulated probiotic under simulated gastrointestinal conditions. Thus, the production of microcapsules by co-extrusion followed by drying using the fluidized bed is a promising strategy for protection of probiotic cells.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Probiotics are microorganisms that may improve health when administered in adequate amounts (FAO/WHO, 2002). Several studies revealed that probiotics may also reduce the incidence of cancer, allergies, inflammatory diseases, lactose intolerance, diarrhea, as well as improve the defenses of the immune system, leading to an additional protection against pathogens (Pandey, Naik, & Vakil, 2015; Parvez, Malik, Kang, & Kim, 2006).

Probiotic products have to contain 10^6 – 10^9 CFU/g to be effective and to confer health benefits to the consumers (Champagne, Ross, Saarela, Hansen, & Charalampopoulos, 2011). However, many factors may affect the viability of probiotics in food, such as the pH, water activity, storage conditions and processing, thereby challenging researchers during the

development of new probiotic products for food industry. To overcome these problems, encapsulation technologies can be used to protect probiotics and to control their release into the intestine (Fávoro-Trindade, Heinemann, & Pedrosa, 2011). One of these technologies is the microencapsulation by vibration, which consists in extruding a solution through a nozzle and applying simultaneously a vibrational frequency to produce a laminar jet (Whelehan & Marison, 2011). Depending on the device, it is used a monocentric or concentric nozzle system, which produces different types of microcapsules, respectively, by extrusion and co-extrusion. The concentric system presents internal and external nozzles that allow the production of reservoir type microcapsules. Shinde, Sun-Waterhouse, and Brooks (2014) evaluated the co-extrusion using alginate and apple skin polyphenols to protect *Lactobacillus acidophilus* in a milk beverage at 4 °C. After 50 days of storage, the decrease on cell viability was very low, indicating that the co-extrusion technology was efficient to protect probiotics.

The wall of microcapsules may be composed of several materials. In this context, alginate is one of the most used polymers for encapsulation of cells because it has a food-grade status (non-toxic) and it is cheap

* Corresponding author at: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Avenida Duque de Caxias Norte, 225, 13635-000 Pirassununga, São Paulo, – Brazil.

E-mail address: marluci.silva@usp.br (M.P. Silva).