

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Tese será disponibilizado somente a partir de 27/10/2022.

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Desenvolvimento de *spread* de avelã e
chocolate contendo probióticos e triglicerídeos
dietéticos**

Izabela de Souza Correia Cozentino

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Daniela
Cardoso Umbelino Cavallini

Coorientadora: Profa. Dra. Ariela
Veloso de Paula

Araraquara
2020

Desenvolvimento de *spread* de avelã e chocolate contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos

Izabela de Souza Correia Cozentino

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Coorientadora: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Araraquara
2020

M882d

Cozentino, Izabela de Souza Correia.

Desenvolvimento de *spread* de avelã e chocolate contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos / Izabela de Souza Correia Cozentino. – Araraquara: [S.n.], 2020.

145 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula.

1. Triglicerídeos modificados. 2. Reator de leito fixo. 3. Óleo de semente de uva. 4. Probiótico. 5. *Spread* de chocolate. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Paula, Ariela Veloso de, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento de spread de chocolate e avelã contendo triglicerídeos dietéticos e probióticos

AUTORA: IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO

ORIENTADORA: DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

COORDINADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP-
Araraquara

Profa. Dra. GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE (Participação Virtual)
Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Prof. Dra. CAROLINE MARIA CALLIARI (Participação Virtual)
Departamento Acadêmico de Alimentos / Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Profa. Dra. RENATA TIEKO NASSU (Participação Virtual)
Embrapa Pecuária Sudeste / EMBRAPA São Carlos, SP

Araraquara, 27 de outubro de 2020

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara.

A Prof^a. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, pelo apoio, paciência e orientação durante todo o projeto, pela amizade e por todo conhecimento compartilhado durante todos esses anos.

A Prof^a. Dra. Ariela Veloso de Paula, pela coorientação, por todos os ensinamentos, auxílio, paciência, amizade e apoio científico durante a realização dos experimentos.

Ao Pesquisador Dr. Valdecir Luccas e a técnica Maria Angélica Razzé pelo suporte na produção e disponibilização da planta piloto do Cereal Chocotec do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL/Campinas.

Ao Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri e aos técnicos Ana Lúcia Martiniano Nasser e Adriana Moura pelo auxílio nas análises no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. À aluna Marina de Freitas Rodrigues pela colaboração com a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Clovis Augusto Ribeiro e ao aluno Jovan Duran Alonso por toda ajuda no Laboratório de Análises Térmicas do IQ – Unesp.

Agradecimentos pessoais

À minha família, pelo incentivo e apoio em todas as fases da minha vida.

Aos meus amigos do Laboratório Virgínia, Juliana, Ana, Giovana, Vinícius, Letícia, Camila, pelo companheirismo e ajuda no dia a dia de trabalho.

Aos técnicos, do Laboratório de Probióticos, Roseli, Josiane e Adriano, pelos ensinamentos, pela ajuda e por todas as contribuições durante estes anos de trabalho e também pelos conselhos profissionais e pessoais.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A modificação controlada de triglicerídeos (TAGs) pode promover uma melhor absorção de ácidos graxos, atuar no controle da obesidade, má absorção de gorduras e interferir na composição da microbiota intestinal. A ingestão diária de microrganismos probióticos pode resultar em modulação positiva da microbiota intestinal e do sistema imunológico, auxiliando na redução de eventuais doenças. Entretanto, a inclusão de TAGs modificados pode alterar as propriedades físico-químicas e reológicas de alimentos e precisa ser investigada. **Objetivo:** este estudo teve o objetivo de desenvolver um *spread* à base de avelã e chocolate potencialmente funcional contendo a cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 e triglicerídeos modificados do tipo MLM (ácidos graxos de cadeia média nas posições *sn*-1,3 e ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn*-2). **Métodos:** Inicialmente, foi realizada a síntese enzimática dos triglicerídeos dietéticos do tipo MLM por acidólise de óleo de semente de uva com ácido graxo de cadeia média (C:10:0), em um reator de leito fixo operado em modo contínuo durante 120h a 45°C. A reação foi catalisada pela lipase comercialmente imobilizada Lipozyme RM IM® (*Rhizomucor miehei*). A caracterização da matéria-prima foi realizada através dos índices de acidez, peróxido e composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa e a caracterização hidrodinâmica do reator foi realizada pela distribuição de tempo-residência (DTR) dos reagentes. Posteriormente, os TAGs foram utilizados na elaboração de *spreads* probióticos, em substituição parcial da gordura vegetal convencional nos níveis de 25g/100g, 50g/100g e 75g/100g. Outras duas formulações foram utilizadas como controle (sem adição de TAGs modificados e sem probióticos) e (sem adição de TAGs modificados e com probióticos). A qualidade dos *spreads* foi avaliada através de análises físico-químicas (composição proximal, atividade de água (A_w), cor, reologia e composição de ácidos graxos), propriedades térmicas e análises microbiológicas (segurança microbiológica e viabilidade da cepa probiótica, durante o período de armazenamento de 180 dias, à temperatura de 20°C). **Resultados:** O perfil médio da concentração de ácidos graxos do óleo de semente de uva mostrou quantidades abundantes dos ácidos graxos mono e poliinsaturados, com maior porcentagem do ácido linoléico (C18:2; 49,44±0,27%). A DTR indicou uma boa qualidade do empacotamento do leito. O progresso da reação foi monitorado pela composição de TAGs e o grau de incorporação (GI) do ácido cáprico alcançou 39,91±2,77% no estado estacionário (a partir de 48h) e um valor máximo de 43,00±5,87% em 54 horas de reação. Após 180 dias de armazenamento à 20°C, a cepa probiótica apresentou viabilidade superior a 8 log UFC/g em todas as formulações avaliadas, evidenciando a compatibilidade dos ingredientes utilizados. Os *spreads* apresentaram-se termicamente estáveis, com teores de proteínas, lipídeos e carboidratos próximos aos verificados para produtos comerciais, sem diferirem significativamente entre si e A_w abaixo de 0,5. Os resultados indicaram que a diminuição da proporção de gordura teve um efeito significativo nas propriedades reológicas dos *spreads* investigados e a adição de 75 g/100g de TAG modificado em substituição à gordura interferiu na

espalhabilidade do produto. Como esperado, a adição de TAG do tipo MLM resultou em aumento no teor de ácido graxo de cadeia média, especificamente de ácido cáprico, e de ácidos graxos insaturados.

Conclusão: Foi possível obter *spread* à base de avelã e chocolate potencialmente funcional contendo probióticos e TAGs modificados dentro das normas microbiológicas, físico-químicas e com melhor qualidade nutricional. Os resultados indicam que a substituição de gordura por triglicerídeos modificados confere o diferencial de qualidade ao produto, pois tais lipídeos apresentam potencial para promover benefícios à saúde sem modificar a qualidade do produto.

Palavras-chave: Triglicerídeos modificados; Reator de leito fixo; Óleo de semente de uva; Probiótico; *Spread* de chocolate.

Abstract

Controlled modification of triglycerides (TAGs) can promote better fatty acid absorption, act in the control of obesity, fat malabsorption and can interfere in the composition of the intestinal microbiota. Daily ingestion of probiotic microorganisms can results in positive modulation of the intestinal microbiota and the immune system, helping to reduce eventual diseases. However, the inclusion of modified TAGs can alter the physical, chemical and rheological properties of foods and needs to be investigated. **Objective:** this study aimed to develop a potentially functional hazelnut and chocolate based spread containing the probiotic strain *Enterococcus faecium* CRL 183 and modified MLM triglycerides (medium-chain fatty acids at positions *sn*-1,3 and long-chain fatty acids at position *sn*-2). **Methods:** Initially, enzymatic synthesis of MLM-type dietary triglycerides was conducted by acidolysis of grape seed oil with medium-chain fatty acid (C:10:0) in a continuous packed bed reactor for 120h at 45°C. The reaction was catalyzed by the commercially immobilized lipase Lipozyme RM IM® (*Rhizomucor miehei*). The characterization of the raw material was conducted through the acidity, peroxide and fatty acid composition by gas chromatography. The hydrodynamic characterization of the reactor was conducted by the distribution of time-residence (DTR) of the reagents. Subsequently, TAGs were used in the preparation of probiotic spreads, in partial replacement of conventional vegetable fat at the levels of 25g / 100g, 50g / 100g and 75g / 100g. Two other formulations were used as controls: without the addition of modified TAGs and probiotics; and without the addition of modified TAGs and with probiotics. The quality of the spreads was assessed through physical-chemical analyzes (proximal composition, water activity (A_w), color, rheology and fatty acid composition), thermal properties and microbiological analyzes (microbiological safety and viability of the probiotic strain, during the 180 day storage period, at a temperature of 20°C). **Results:** The average fatty acid concentration profile of grape seed oil showed abundant amounts of mono and polyunsaturated fatty acids, with a higher percentage of linoleic acid (C18:2; 49.44±0.27%). The DTR indicated a good quality of bed packing. The reaction progress was monitored by the composition of TAGs and the degree of incorporation (ID) of capric acid at the steady state (after 48 h of reaction) achieved a value of 39.91±2.77% and a maximum value of 43.00±5.87% in 54 hours of reaction. After 180 days of storage at 20°C, the probiotic strain showed viability greater than 8 log CFU/g in all the formulations evaluated, showing the compatibility of the ingredients used. The spreads were thermally stable, with levels of proteins, lipids and carbohydrates close to those verified for commercial products, without differing significantly between themselves and with A_w below 0.5. Results indicated that the decrease in the proportion of fat has a significant effect on the rheological properties of the investigated spreads and the addition of 75 g/ 100g of modified TAG to replace the fat interfered with the spreadability of the product. As expected, the addition of MLM-type TAG resulted in an increase in the content of medium chain fatty acid, specifically capric acid, and unsaturated fatty acids. **Conclusion:** This study showed the possibility to obtain a spread based on hazelnut and potentially functional chocolate containing probiotics

and modified TAGs within microbiological, physical-chemical standards and with better nutritional quality. Results indicate that the substitution of fat for modified triglycerides gives the product a quality differential, as these lipids have the potential to promote health benefits without changing the quality of the product.

Keywords: Modified triglycerides; Packed bed reactor; Grape seed oil; Probiotic; Chocolate spread.

SUMÁRIO

Introdução	11
Capítulo 1.....	Erro! Indicador não definido.
Enzymatic synthesis of structured lipids from grape seed (<i>Vitis vinifera</i> L.) oil in associated packed bed reactors.....	Erro! Indicador não definido.
Abstract.....	Erro! Indicador não definido.
Introduction	Erro! Indicador não definido.
Material and methods.....	Erro! Indicador não definido.
Results and Discussion.....	Erro! Indicador não definido.
Conclusions.....	Erro! Indicador não definido.
References.....	Erro! Indicador não definido.
Capítulo 2.....	Erro! Indicador não definido.
Desenvolvimento de <i>spread</i> de chocolate potencialmente funcional contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos	Erro! Indicador não definido.
Resumo.....	Erro! Indicador não definido.
Introdução	Erro! Indicador não definido.
Material e Métodos.....	Erro! Indicador não definido.
Resultados e Discussão.....	Erro! Indicador não definido.
Conclusão	Erro! Indicador não definido.
Referências.....	Erro! Indicador não definido.
Considerações finais.....	25
Referências.....	26
Apêndices	Erro! Indicador não definido.

Introdução

O chocolate é um dos alimentos mais populares e amplamente consumidos no mundo por todas as gerações, por criar uma série de estímulos que ativam os centros de prazer no cérebro humano (1,2). Apesar de possuir alto conteúdo calórico, principalmente formado pelas gorduras e açúcares, apresenta em sua composição substâncias antioxidantes como os polifenóis, em especial os flavonóides (epicatequinas, catequinas e procianidinas) e alguns minerais (potássio, fósforo, cobre, ferro, zinco e magnésio) (3).

Os *spreads* à base de cacau, são produtos nos quais o cacau é misturado com outros ingredientes geralmente à base de gordura sólida (gorduras hidrogenadas ou com altos teores de ácidos graxos saturados) para preparar uma pasta espalhável muito utilizada por profissionais da confeitaria em recheios e coberturas de bolos ou até mesmo em pães e torradas, podendo ser adicionados de pastas de nozes, macadâmia, castanha de caju ou avelã (4–6). A legislação brasileira define “Massa (ou pasta ou liquor) de cacau como o produto obtido das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) por processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos” (7).

Os *spreads* de gorduras possuem propriedades de emulsões plásticas ou fluídas compostas principalmente de água, óleos e gorduras com a capacidade de ser espalhável à temperatura ambiente (4,8). No entanto, como a estrutura dos *spreads* está fortemente relacionada ao desempenho da concentração lipídica, o grande desafio tecnológico está em desenvolver tais produtos com baixos teores de gorduras saturadas e hidrogenadas que

mantenham as mesmas características de sabor, textura e espalhabilidade que os produtos originais (1,4,5,9).

As gorduras são componentes importantes de uma grande variedade de alimentos e seu consumo excessivo na dieta têm sido associado ao surgimento de doenças crônicas, tais como: obesidade, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (10). Entretanto, tem sido verificado que o consumo de determinados óleos e gorduras causa efeito positivo à saúde, por conterem além de ácidos graxos insaturados, ácidos graxos essenciais importantes na redução de biomarcadores lipídicos (11–13), serem associados a menor ganho de peso devido à diminuição da deposição de gordura e aumento da saciedade (12,14,15), e diminuição de citocinas inflamatórias (16). Uma forma de melhorar o perfil nutricional e o desempenho de alimentos inclui a busca por novos processos de produção, que sejam capazes de conferir características específicas ao produto final. Com o aumento do conhecimento sobre os efeitos dos ácidos graxos no metabolismo, há crescente interesse em utilizar óleos e gorduras modificados, na redução do risco de doenças e promoção da saúde (17).

Neste contexto, a modificação de óleos vegetais visando à síntese de lipídeos estruturados, especificamente os triglicerídeos dietéticos, tem sido bastante estudada, pois permite a substituição de ácidos graxos na molécula do TAG (17–22), e, conseqüentemente, possuindo potencial para auxiliar no controle da obesidade, insuficiência pancreática, má absorção de gorduras e outras doenças metabólicas, constituindo um meio efetivo de fornecimento de ácidos graxos desejados para fins terapêuticos ou nutricionais (21). O TAG

modificado possui novas propriedades sensoriais, físicas (ponto de fusão, viscosidade, consistência), químicas (estabilidade oxidativa), bem como propriedades nutricionais (presença ou ausência de ácidos graxos saturados ou insaturados específicos) (23).

Estes são atualmente muito utilizados em aplicações médicas e na indústria alimentar em produtos de confeitaria e chocolates (24–26). Alguns exemplos de lipídeos estruturados, obtidos por modificação enzimática de óleos e gorduras, incluem os substitutos da manteiga de cacau, os substitutos da gordura de leite humano, os triglicerídeos ricos em ácidos graxos essenciais (ômega-3 e ômega-6) e os triglicerídeos de baixa caloria, chamados dietéticos (24).

Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) referem-se a triacilgliceróis mistos de ácidos graxos saturados com um comprimento de cadeia de 6-12 átomos de carbono, isto é, ácido hexanóico (C6:0, ácido capríco), ácido octanóico (C8:0, ácido caprílico), ácido decanóico (C10:0, ácido cáprico) e ácido dodecanóico (C12:00, ácido láurico) (27,28). Tais TAGs são sintetizados com o objetivo de aplicações nutricionais clínicas como nos casos de insuficiência pancreática, má absorção de gordura, transporte deficiente de quilomícron via sistema linfático, hipertrigliceridemia grave, nutrição parenteral total e em fórmulas para prematuros (29).

Os triglicerídeos podem variar de acordo com sua composição em ácidos graxos saturados e insaturados; com comprimento da cadeia de ácidos graxos e na distribuição de diferentes ácidos graxos na molécula de TAG nas posições *sn*-1, *sn*-3 ou *sn*-2 (21,30). Esta posição dos ácidos graxos nas

moléculas do TAG (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) podem ter um impacto significativo no metabolismo humano (31). Os tipos mais comuns de TAG dietéticos são: (i) SLS (um TAG com ácidos graxos de cadeia curta, nas posições *sn*- 1 e *sn*- 3, e de cadeia longa, na posição interna); (ii) MLM (um TAG com ácidos graxos de cadeia média, nas posições *sn*- 1 e *sn*- 3, e de cadeia longa, na posição interna); e (iii) MMM (um TAG com ácidos graxos de cadeia média, em todas as posições da cadeia de TAG) (Figura 1) (21,30,31).

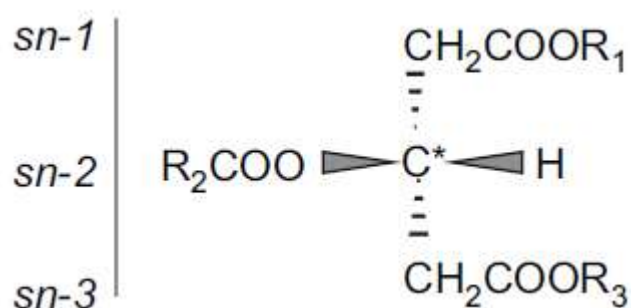


Figura 1. Representação da distribuição de ácido graxo (R1, R2, R3) na estrutura de uma molécula de um TAG. Fonte: Bourlieu et al. (32).

A absorção dos ácidos graxos de cadeia média é mais rápida e mais eficiente do que a dos ácidos graxos de cadeia longa, devido o seu tamanho reduzido e maior solubilidade (26,27). Ademais, os ácidos graxos de cadeia média atravessam facilmente a membrana mitocondrial e são transportados diretamente para o fígado, através da circulação portal, proporcionando uma rápida oxidação (28,33). Estudos em modelo animal e humano mostram que os TCMs resultam em menor ganho de peso, associado com uma diminuição

da deposição de gordura, aumento da taxa metabólica de repouso e do gasto energético pós-prandial, pois tais substâncias ajudam a reduzir a ingestão de alimentos por aumentar a saciedade, alterando assim o consumo de energia (14,34).

Os TCMs também são associados à modulação do perfil lipídico e consequente redução do risco de desenvolvimento de aterosclerose (35). Sengupta e Ghosh (36) utilizaram um óleo de mostarda enriquecido com TCM e obtiveram como resultado a diminuição dos níveis de colesterol no plasma. No fígado, os ácidos graxos de cadeia média contido no TCM são prontamente β -oxidados para formar acetil-CoA, que é a molécula de partida para a biossíntese do colesterol. O número de moléculas de acetil-CoA produzidas pelos ácidos graxos de cadeia média é muito menor em comparação com o ácido graxo de cadeia longa levando à sequência, uma diminuição da síntese do colesterol (37).

A mucosa intestinal impede a invasão de microrganismos patogênicos, fortalecendo a barreira intestinal através da secreção de proteínas antimicrobianas, muco e imunoglobulina A (IgA), que dificultam a multiplicação excessiva de bactérias indesejáveis no trato gastrointestinal (38,39). O sistema imunológico associado à mucosa intestinal, tem se desenvolvido de maneira eficiente para controlar a população destes microrganismos, protegendo o hospedeiro contra invasões microbianas e reações indesejadas contra antígenos alimentares (39,40). Sendo assim, a composição da alimentação é considerada um dos principais fatores que contribuem para a

diversidade da microbiota intestinal no homem, podendo afetar a resposta imunológica local (40).

Os TCMs também têm sido associados a melhora da saúde do intestino sob condições inflamatórias, modulando o número de linfócitos intra-epiteliais e a expressão de citocinas no intestino delgado (19). Estudo conduzido por Kono et al. (41) concluiu que a ingestão regular de TCM protege o intestino de ratos induzidos à colite por meio da modulação da resposta imune a lipopolissacarídeos e o aumento da expressão de IgA.

Os lipídeos modificados podem ser produzidos através de reações de ácidos graxos de cadeia média de gorduras vegetais ou animais. e os processos são conhecidos como interesterificação, alcoólise ou acidólise e têm sido utilizados em pequena e grande escala na produção dos TAGs (42–44).

A reação de acidólise é um processo reversível que envolve duas etapas de hidrólise e esterificação com uma nova ligação éster e liberação de um novo ácido graxo livre (Figura 2) (23,45). A acidólise enzimática de lipídeos estruturados, catalisada por lipases, apresenta diversas vantagens em relação aos métodos químicos como controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, separação e purificação dos produtos (43,45,46). Além disso, requer condições mais brandas de temperatura com menor consumo de energia, bem como pouca e/ou nenhuma formação de subprodutos (21,23,27,43,45,47–49). O controle das condições de reação como, carga enzimática, tempo e temperatura de reação e relação de

substrato, são extremamente importantes para minimizar a formação de produtos indesejáveis (45).

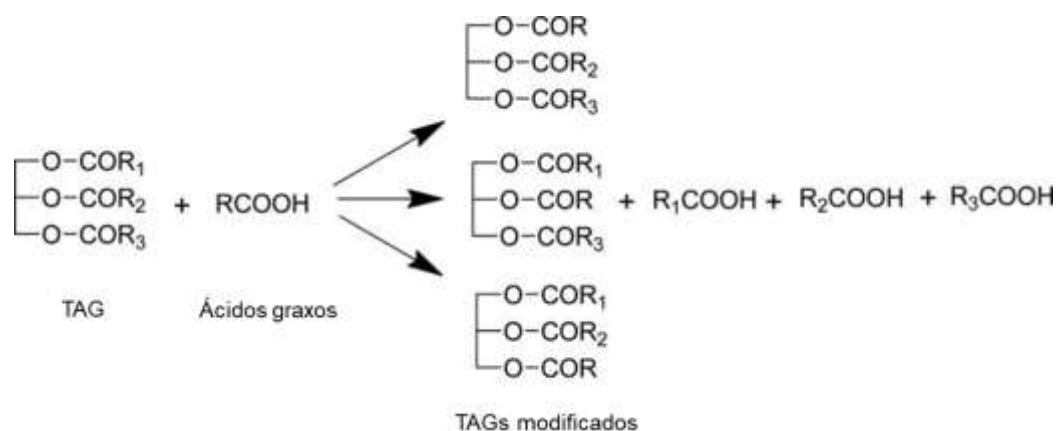


Figura 2. Esquema representativo de uma reação de acidólise. Fonte: Kadhum e Shamma (50).

As lipases (triacilglicerol-acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são biocatalisadores que hidrolisam total ou parcialmente a molécula do triacilglicerol podendo ser inespecíficas (atuam igualmente nos três ácidos graxos dos triacilgliceróis), ou regioespecíficas (vão atuar especificamente sobre os ácidos graxos em certas posições da molécula do glicerol) (46,51). As lipases *sn*-1,3 específicas são mais promissoras e constituem os biocatalisadores mais eficientes em sintetizar os TAGs devido à sua quimio e estereo-seletividade, versatilidade e elevada regioespecificidade em produzir produtos finais específicos (23,51,52). Um exemplo, é a Lipozyme RM IM, lipase microbiana imobilizada do fungo *Rhizomucor miehei*, amplamente utilizada nestas reações (45). Apesar do alto custo comercial, a utilização de lipases imobilizadas pode ser considerada viável devido à possibilidade de recuperação e reutilização e consequentemente redução do custo operacional (43,46,51,53). As

vantagens de se empregar um biocatalisador imobilizado tornam-se ainda mais evidentes quando há o desenvolvimento de processos em reatores operando em modo contínuo (54).

Com base nessa perspectiva, muita atenção tem sido direcionada para as diferentes configurações dos reatores, que oferecem melhores rendimentos em um menor intervalo de tempo e melhor controle do processo (49).

As configurações de reatores enzimáticos mais utilizados são: reatores de tanque agitado, reatores de coluna de leito fluidizado e reatores de coluna de leito fixo, que podem operar em modo batelada ou contínuo (Figura 3) (54). A seleção do tipo de reator mais apropriado nas reações enzimáticas depende de algumas condições do biocatalisador, da hidrodinâmica do sistema e da cinética das reações (51).

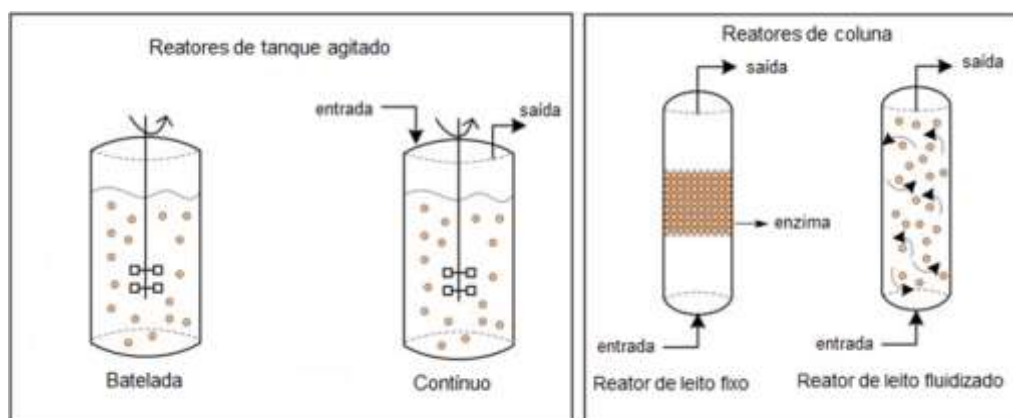


Figura 3. Representação das configurações dos principais tipos de reatores.

Fonte: Poppe et al. (54).

Os reatores de tanque agitado são os mais simples, de fácil manuseio, controle da reação e alto grau de dispersão do substrato. Nestes reatores

quando operados em regime de batelada, o biocatalisador é colocado com o substrato sob agitação, e controle de tempo e temperatura. Para recuperar e separar o biocatalisador do produto normalmente é realizada a centrifugação, filtração ou decantação (54). Esse processo apresenta algumas desvantagens como baixo rendimento para o uso em escala industrial, baixa taxa de conversão do substrato em produto e possível estresse de cisalhamento do suporte devido à agitação mecânica durante o processo (46,54). Para minimizar estes problemas, reatores de tanque agitado operando de forma contínua têm sido utilizados devido à possibilidade de separação do biocatalisador através de membranas na saída do reator (54).

Nos reatores de leito fluidizado, o biocatalisador e o substrato da reação fluem através de um reator de coluna, determinados por um fluxo ascendente e pelo volume do reator (51,54). Uma das grandes vantagens é a possibilidade de se utilizar partículas menores sem interferir na pressão do meio, consequentemente evitando a formação de caminhos preferenciais (55). No entanto, o tempo de residência necessário para fluidizar o meio, mediado pela alta vazão do sistema, pode ocasionar menores rendimentos e dificuldades de aplicação em grande escala (54).

Dentre os reatores operados no modo contínuo, reatores de leito fixo são os mais utilizados para processos enzimáticos devido à aplicação de reações de grande escala, facilidade de operação, remoção contínua do produto com menor estresse de cisalhamento do suporte, resultando em alta eficiência da reação (17,49,52,53,56,57). Nestes reatores, o biocatalisador é fixo dentro da coluna, enquanto o substrato da reação é bombeado por meio de um fluxo

específico caracterizando o tempo de residência de acordo com o volume do reator (46,51,53,54). Os produtos podem ser recirculados para a mesma coluna ou coletados em recipientes próprios (46). Algumas desvantagens das reações de leito fixo incluem a facilidade de obstrução do leito e consequentemente, redução da eficiência catalítica e a formação de caminhos preferenciais (51,53).

Na grande maioria dos estudos, a síntese dos TAGs dietéticos do tipo MLM é realizada em reatores de tanque agitado operados em batelada, indicando a necessidade de estudos que visem à possibilidade de aplicação desses biocatalisadores em outra configuração de reator (10,21,23,58–61). Este fato destaca a importância de se explorar a capacidade de novos reatores operados no modo contínuo para aumentar a eficiência das reações de TAGs.

Além da configuração do biorreator utilizado para a produção dos TAGs, a escolha dos óleos vegetais é outro ponto importante a ser considerado nos processos enzimáticos. Os óleos vegetais extraídos das sementes de plantas são conhecidos por serem uma boa fonte nutricional, de importância industrial e farmacêutica (62). As propriedades dos óleos vegetais utilizados nas reações variam em função da região geográfica, variedade, condições de cultivo e disponibilidade das plantas (51).

As sementes de uva (*Vitis vinifera* L.), resíduo agrícola da indústria do vinho, são fontes de antioxidantes naturais, como vitamina E, polifenóis e flavonóides, importantes para a saúde humana e a sua utilização para a produção em TAGs agregaria valor econômico para a indústria do vinho (58,63–65). Nos últimos anos, as indústrias de alimentos buscaram por

antioxidantes naturais de origem vegetal. Os extratos de semente de uva além da atividade antioxidante possuem também atividade antimicrobiana, capacidade de inibir a oxidação lipídica e prolongar a vida útil dos produtos (66,67).

O óleo de semente de uva contém alto teor de ácidos graxos insaturados, que representam mais de 89% da composição total do óleo, principalmente o ácido linoléico (58-78%) (68–71). A semente de uva tem despertado o interesse dos setores alimentício e farmacêutico, em função de seus potenciais efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, atuando na redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, obesidade, colesterol (69,72,73).

A conscientização e interesse dos consumidores em relação a uma alimentação mais saudável têm impulsionado o desenvolvimento de alimentos funcionais que promovam benefícios à saúde e redução do risco de doenças (22). Neste contexto, os probióticos têm despertado o interesse do setor alimentício na promoção da saúde.

Uma das primeiras definições de probióticos foi proposta por Fuller (74). Segundo esse pesquisador, são definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que agem no trato gastrointestinal, mantendo ou melhorando o equilíbrio da microbiota. Estes microrganismos precisam ser administrados em uma quantidade adequada para conferir benefícios à saúde. Internacionalmente, probióticos são definidos como: “microrganismos vivos que, quando administrados em doses apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (75,76). Para que o microrganismo probiótico exerça seus efeitos sistêmicos, este deve sobreviver às diferentes etapas de

processamento, às condições de armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal, sendo capaz de colonizar, mesmo que temporariamente o intestino (77,78).

Em 2018, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) anunciou os novos requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, que deve ser demonstrada através de documentos técnicos ou de estudos científicos que assegurem o histórico de uso seguro, ausência de registros de eventos adversos, ausência de fatores de virulência e patogenicidade, ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde humana, ausência de resistência potencialmente transferível a antibióticos relevantes para a saúde humana e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (79).

Inúmeros são os benefícios que os probióticos podem proporcionar à saúde, como: aumento da resistência contra patógenos, por efeitos antagônicos contra grupos específicos de organismos e competição por nutrientes (80,81); modulação do sistema imune e do perfil lipídico (74,78,82–85), redução do desenvolvimento de câncer e alívio dos sintomas de doenças inflamatórias intestinais e de diarreias (86–90).

Considerando que os seus efeitos são cepa-dependentes, como já documentado em diferentes estudos (91), a seleção de cepas probióticas é um passo decisivo para que os efeitos benéficos à saúde sejam observados e deve atender às necessidades da população alvo do produto (78).

Enterococcus spp. é um gênero de bactérias Gram-positivas, composto por 16 espécies que se multiplicam e sobrevivem em condições adversas.

Cepas específicas de *Enterococcus* spp. principalmente as pertencentes a espécie *Enterococcus faecium*, são consideradas probióticas por melhorar o equilíbrio microbiano do trato gastrointestinal e exercerem outros efeitos benéficos à saúde (82,92). Estudos anteriores realizados no grupo de pesquisa mostraram que a cepa *E. faecium* CRL 183 apresenta efeitos benéficos à saúde, comprovados em estudos *in vitro*, em animais e em humanos (82,93–98). Os resultados obtidos indicam que a cepa de *E. faecium* CRL 183 apresenta capacidade de modulação do perfil lipídico e da microbiota intestinal (82,93), redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (97) e mama (98) e melhora nos sintomas de doenças inflamatórias intestinais (86,96).

Os microrganismos probióticos podem ser incorporados em produtos lácteos como iogurtes, leites fermentados, sobremesas à base de leite e queijos e também em produtos não lácteos como cereais, néctar de frutas, salames, gomas de mascar e sucos (99).

A crescente demanda do mercado consumidor por novos produtos, que apresentem características sensoriais adequadas, maior vida útil e maior valor nutricional, justifica o investimento para diversificação de alimentos contendo cepas probióticas (100,101).

Os produtos à base de chocolate são considerados veículos adequados para probióticos pelo efeito protetor conferido pelo lipídeo, além de possuírem propriedades benéficas à saúde e características sensoriais que atraem o consumidor. Tais produtos também passaram por mudanças nos últimos anos, em resposta à busca do consumidor por produtos mais saudáveis,

resultando em formulações com redução nos teores de açúcares e gordura (99).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi obter um *spread* de chocolate e avelã potencialmente funcional contendo a cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 e triglicerídeos modificados do tipo MLM.

Considerações finais

Foi possível produzir lipídeos estruturados do tipo MLM por acidólise enzimática de óleo de semente de uva catalisada pela Lipozyme RM IM em reator de leito fixo. A Lipozyme RM IM mostrou-se altamente estável com a incorporação do C10:0 ao longo de 120h de reação. O grau de incorporação observado mostrou como esse sistema é promissor para aplicação industrial, uma vez que foi alcançado um valor máximo de 43,0% em 54 horas de reação. Os resultados deste trabalho poderão auxiliar a indústria de alimentos na incorporação de TAG do tipo MLM, uma vez que o óleo de semente de uva mostrou-se uma importante fonte de ácidos graxos poli-insaturados essenciais.

Os *spreads* de chocolate e avelã, com incorporação do microrganismo probiótico *E. faecium* CRL 183 e com substituição de 25g/100g e 50g/100g da gordura por TAG modificados do tipo MLM, desenvolvidos no presente estudo, apresentam potencial para atuar no controle da obesidade, melhora da absorção dos ácidos graxos essenciais, modulação do perfil lipídico e da resposta imune, em função da presença da cepa probiótica e dos TAGs modificados, sendo uma alternativa para melhorar o perfil nutricional dos alimentos e tem como função diversificar o mercado de alimentos funcionais.

Estudos adicionais para verificar o efeito dos *spreads* desenvolvidos na modulação da microbiota, obesidade, doenças inflamatórias intestinais, entre

outras condições, são necessários para confirmar o potencial funcional do produto.

Referências

1. Bouaziz MA, Abbes F, Mokni A, Blecker C, Attia H, Besbes S. The addition effect of Tunisian date seed fibers on the quality of chocolate spreads. *J Texture Stud* [Internet]. 2017 Apr;48(2):143–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jtxs.12225>
2. Barišić V, Kopjar M, Jozinović A, Flanjak I, Ačkar Đ, Miličević B, et al. The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules* [Internet]. 2019 Aug 30;24(17):3163. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/17/3163>
3. Kobus-Cisowska J, Szymanowska D, Maciejewska P, Szczepaniak O, Kmiecik D, Gramza-Michałowska A, et al. Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients. *Food Funct* [Internet]. 2019;10(2):997–1006. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8FO02099J>
4. Patel AR, Rajarethinem PS, Grędowska A, Turhan O, Lesaffer A, De Vos WH, et al. Edible applications of shellac oleogels: spreads, chocolate paste and cakes. *Food Funct* [Internet]. 2014;5(4):645–52. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4FO00034J>
5. Jeyarani T, Banerjee T, Ravi R, Krishna AGG. Omega-3 fatty acids enriched chocolate spreads using soybean and coconut oils. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Feb 6;52(2):1082–8. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1053-4>

6. Codex Alimentarius Commission. General Standard for Food Additives. Codex Stan 192-1995. 2015. p. 490.
7. Brasil. Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. 2005. p. 1–6.
8. Codex Alimentarius Commission. Codex Stan 256-2007 Standard For Fat Spreads and Blended Spreads. 2007. p. 1–5.
9. El-Hadad NNM, Youssef MM, Abd El-Aal MH, Abou-Gharbia HH. Utilisation of red palm olein in formulating functional chocolate spread. Food Chem [Internet]. 2011 Jan;124(1):285–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.034>
10. Zhao X, Wang X-D, Liu X, Zhu W, Mei Y, Li W, et al. Structured lipids enriched with unsaturated fatty acids produced by enzymatic acidolysis of silkworm pupae oil using oleic acid. Eur J Lipid Sci Technol [Internet]. 2015 Jun;117(6):879–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201400438>
11. Reena MB, Gowda LR, Lokesh BR. Enhanced Hypcholesterolemic Effects of Interesterified Oils Are Mediated by Upregulating LDL Receptor and Cholesterol 7- α - Hydroxylase Gene Expression in Rats. J Nutr [Internet]. 2011 Jan 1;141(1):24–30. Available from: <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.110.127027>
12. Sengupta A, Roy S, Mukherjee S, Ghosh M. Production of Medium Chain Fatty Acid Rich Mustard Oil Using Packed Bed Bioreactor. J Oleo Sci [Internet]. 2015;64(2):153–9. Available from:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/64/2/64_ess14184/_article

13. Vafeiadou K, Weech M, Altowaijri H, Todd S, Yaqoob P, Jackson KG, et al. Replacement of saturated with unsaturated fats had no impact on vascular function but beneficial effects on lipid biomarkers, E-selectin, and blood pressure: results from the randomized, controlled Dietary Intervention and VAScular function (DIVAS) study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2015 Jul 1;102(1):40–8. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/102/1/40/4564241>
14. Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeir J. Medium-chain triglycerides. *Int Dairy J* [Internet]. 2006 Nov;16(11):1374–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694606001609>
15. Maljaars J, Romeyn EA, Haddeman E, Peters HP, Masclee AA. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2009 Apr 1;89(4):1019–24. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/89/4/1019/4596700>
16. Papada E, Kaliora AC, Gioxari A, Papalois A, Forbes A. Anti-inflammatory effect of elemental diets with different fat composition in experimental colitis. *Br J Nutr* [Internet]. 2014 Apr 14;111(7):1213–20. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114513003632/type/journal_article
17. Xie W, Zhang C. Propylsulfonic and arenesulfonic functionalized SBA-15 silica as an efficient and reusable catalyst for the acidolysis of soybean oil with medium-chain fatty acids. *Food Chem* [Internet]. 2016

- Nov;211:74–82. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.025>
18. Cao Y, Qi S, Zhang Y, Wang X, Yang B, Wang Y. Synthesis of Structured Lipids by Lipase-Catalyzed Interesterification of Triacetin with Camellia Oil Methyl Esters and Preliminary Evaluation of their Plasma Lipid-Lowering Effect in Mice. *Molecules* [Internet]. 2013 Mar 25;18(4):3733–44. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/4/3733>
 19. Liu Y. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 2015 Dec 9;6(1):41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40104-015-0040-1>
 20. Xie W, Hu P. Production of Structured Lipids Containing Medium-Chain Fatty Acids by Soybean Oil Acidolysis Using SBA-15-pr-NH₂–HPW Catalyst in a Heterogeneous Manner. *Org Process Res Dev* [Internet]. 2016 Mar 18;20(3):637–45. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.oprd.5b00381>
 21. Abed SM, Wei W, Ali AH, Korma SA, Mousa AH, Hassan HM, et al. Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *LWT* [Internet]. 2018 Jul;93(March):306–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.057>
 22. Yüksel-Bilsel A, Şahin-Yeşilçubuk N. Production of probiotic kefir fortified with encapsulated structured lipids and investigation of matrix effects by means of oxidation and in vitro digestion studies. *Food Chem.*

- 2019;296(February):17–22.
23. Kavadia MR, Yadav MG, Odaneth AA, Lali AM. Synthesis of designer triglycerides by enzymatic acidolysis. *Biotechnol Reports* [Internet]. 2018 Jun;18:e00246. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00246>
 24. Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron J Biotechnol* [Internet]. 2013 May 15;16(3):1–38. Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/1417>
 25. Kadivar S, De Clercq N, Mokbul M, Dewettinck K. Influence of enzymatically produced sunflower oil based cocoa butter equivalents on the phase behavior of cocoa butter and quality of dark chocolate. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2016 Mar;66:48–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815302243>
 26. Yüksel A, Şahin-Yeşilçubuk N. Encapsulation of structured lipids containing medium- and long chain fatty acids by complex coacervation of gelatin and gum arabic. *J Food Process Eng* [Internet]. 2018 Dec 12;41(8):e12907. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpe.12907>
 27. Lu J, Jin Q, Wang X, Wang X. Preparation of medium and long chain triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a solvent-free system. *Process Biochem* [Internet]. 2017 Mar;54:89–95. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.015>
28. Žáček P, Bukowski M, Mehus A, Johnson L, Zeng H, Raatz S, et al. Dietary saturated fatty acid type impacts obesity-induced metabolic dysfunction and plasma lipidomic signatures in mice. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2019 Feb;64:32–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286318306351>
 29. Esperón-Rojas AA, Baeza-Jiménez R, Cano-Sarmiento C, García HS. Structured Mono- and Diacylglycerols with a High Content of Medium Chain Fatty Acids. *J Oleo Sci* [Internet]. 2017;66(9):991–6. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/66/9/66_ess17010/_article
 30. Wang Y, Xia L, Xu X, Xie L, Duan Z. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2012 Oct;90(4):707–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.02.003>
 31. Nunes PA, Pires-Cabral P, Ferreira-Dias S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chem* [Internet]. 2011 Aug;127(3):993–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.071>
 32. Bourlieu C, Bouhallab S, Lopez C. Biocatalyzed modifications of milk lipids: applications and potentialities. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2009 Oct;20(10):458–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224409001794>
 33. Lee Y, Tang T, Lai O. Health Benefits, Enzymatic Production, and

- Application of Medium- and Long-Chain Triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review. *J Food Sci* [Internet]. 2012 Aug;77(8):R137–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02793.x>
34. Hu J-N, Shen J-R, Xiong C-Y, Zhu X-M, Deng Z-Y. Investigation of Lipid Metabolism by a New Structured Lipid with Medium- and Long-Chain Triacylglycerols from *Cinnamomum camphora* Seed Oil in Healthy C57BL/6J Mice. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2018 Feb 28;66(8):1990–8. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b05659>
 35. Korrapati D, Jeyakumar SM, Putcha UK, Mendu VR, Ponday LR, Acharya V, et al. Coconut oil consumption improves fat-free mass, plasma HDL-cholesterol and insulin sensitivity in healthy men with normal BMI compared to peanut oil. *Clin Nutr* [Internet]. 2018 Dec;38(4):1956. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561419302134>
 36. Sengupta A, Ghosh M. Hypolipidemic effect of mustard oil enriched with medium chain fatty acid and polyunsaturated fatty acid. *Nutrition* [Internet]. 2011 Nov;27(11–12):1183–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.010>
 37. Courchesne-Loyer A, Lowry C-M, St-Pierre V, Vandenberghe C, Fortier M, Castellano C-A, et al. Emulsification Increases the Acute Ketogenic Effect and Bioavailability of Medium-Chain Triglycerides in Humans. *Curr Dev Nutr* [Internet]. 2017 Jul;1(7):e000851. Available from: <https://academic.oup.com/cdn/article/4259865>
 38. Martínez I, Perdicaro DJ, Brown AW, Hammons S, Carden TJ, Carr TP,

- et al. Diet-Induced Alterations of Host Cholesterol Metabolism Are Likely To Affect the Gut Microbiota Composition in Hamsters. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2013 Jan 15;79(2):516–24. Available from: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03046-12>
39. Carey H V., Assadi-Porter FM. The Hibernator Microbiome: Host-Bacterial Interactions in an Extreme Nutritional Symbiosis. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2017 Aug 21;37(1):477–500. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-071816-064740>
 40. Ferrara F, Tedin L, Pieper R, Meyer W, Zentek J. Influence of medium-chain fatty acids and short-chain organic acids on jejunal morphology and intra-epithelial immune cells in weaned piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* [Internet]. 2017 Jun;101(3):531–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpn.12490>
 41. Kono H, Fujii H, Ishii K, Hosomura N, Ogiku M. Dietary medium-chain triglycerides prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res* [Internet]. 2010 Mar;155(3):131–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2009.08.011>
 42. Soumanou MM, Pérignon M, Villeneuve P. Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2013 Mar;115(3):270–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201200084>
 43. Kim J, Chung M-Y, Choi H-D, Choi I-W, Kim BH. Enzymatic Synthesis of Structured Monogalactosyldiacylglycerols Enriched in Pinolenic Acid.

- J Agric Food Chem [Internet]. 2018 Aug 12;66(30):8079–85. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b02599>
44. Araújo MEMB de, Campos PRB, Alberto TG, Contesini FJ, Carvalho P de O. Synthesis of structured triacylglycerols enriched in n-3 fatty acids by immobilized microbial lipase. Brazilian J Microbiol [Internet]. 2016 Oct;47(4):1006–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216305676>
 45. Zou X-G, Hu J-N, Zhao M-L, Zhu X-M, Li H-Y, Liu X-R, et al. Lipozyme RM IM-Catalyzed Acidolysis of Cinnamomum camphora Seed Oil with Oleic Acid To Produce Human Milk Fat Substitutes Enriched in Medium-Chain Fatty Acids. J Agric Food Chem [Internet]. 2014 Oct 29;62(43):10594–603. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf503691p>
 46. Guldhe A, Singh B, Mutanda T, Permaul K, Bux F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. Renew Sustain Energy Rev [Internet]. 2015 Jan;41:1447–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114008089>
 47. Chnadhapuram M, Sunkireddy YR. Preparation of palm olein enriched with medium chain fatty acids by lipase acidolysis. Food Chem [Internet]. 2012 May;132(1):216–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.059>
 48. Moreira DKT, Santos PS, Gambero A, Macedo GA. Evaluation of structured lipids with behenic acid in the prevention of obesity. Food Res Int [Internet]. 2017 May;95:52–8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.005>

49. Salvi HM, Kamble MP, Yadav GD. Synthesis of Geraniol Esters in a Continuous-Flow Packed-Bed Reactor of Immobilized Lipase: Optimization of Process Parameters and Kinetic Modeling. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2018 Feb 23;184(2):630–43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-017-2572-7>
50. Kadhum AAH, Shamma MN. Edible lipids modification processes: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2017 Jan 2;57(1):48–58. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2013.848834>
51. Poppe JK, Matte CR, de Freitas VO, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Záchia Ayub MA. Enzymatic synthesis of ethyl esters from waste oil using mixtures of lipases in a plug-flow packed-bed continuous reactor. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2018 Jul;34(4):952–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.2650>
52. Wang J, Liu X, Wang X, Dong T, Zhao X, Zhu D, et al. Selective synthesis of human milk fat-style structured triglycerides from microalgal oil in a microfluidic reactor packed with immobilized lipase. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016 Nov;220:132–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.023>
53. Zenevycz MCP, Jacques A, Silva MJA, Furigo A, Oliveira V, de Oliveira D. Study of a reactor model for enzymatic reactions in continuous mode coupled to an ultrasound bath for esters production. *Bioprocess Biosyst Eng* [Internet]. 2018 Nov 16;41(11):1589–97. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s00449-018-1985-1>

54. Poppe JK, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015 Sep;33(5):511–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.011>
55. Feng X, Patterson DA, Balaban M, Fauconnier G, Emanuelsson EAC. The spinning cloth disc reactor for immobilized enzymes: A new process intensification technology for enzymatic reactions. *Chem Eng J* [Internet]. 2013 Apr;221:407–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894713001836>
56. Ganguly S, Nandi S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. *Biochem Eng J* [Internet]. 2015 Oct;102:2–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.020>
57. Ma B, Yu H, Pan J, Xu J. High-yield production of enantiopure 2-hydroxy-2-(2'-chlorophenyl) acetic acid by long-term operation of a continuous packed bed reactor. *Biochem Eng J* [Internet]. 2016 Mar;107:45–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.002>
58. Costa CM, Osório NM, Canet A, Rivera I, Sandoval G, Valero F, et al. Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2018 Jan;120(1):1700320. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201700320>
59. Bassan N, Rodrigues RH, Monti R, Tecelão C, Ferreira-Dias S, Paula A V. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to

- obtain dietary triacylglycerols in a batch reactor. LWT [Internet]. 2019 Jan;99(May):600–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.013>
60. Ifeduba EA, Akoh CC. Modification of Stearidonic Acid Soybean Oil by Immobilized *Rhizomucor miehei* Lipase to Incorporate Caprylic Acid. J Am Oil Chem Soc [Internet]. 2014 Jun 22;91(6):953–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-014-2433-2>
 61. Silroy S, Sengupta A, Bhattacharyya DK, Ghosh M. Optimization of reaction parameters of acidolysis reaction between mustard oil and capric acid by using *Thermomyces lanuginosus* lipase. J Food Sci Technol [Internet]. 2014 Apr 11;51(4):715–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0543-5>
 62. Amri Z, Lazreg-Aref H, Mekni M, El-Gharbi S, Dabbaghi O, Mechri B, et al. Oil Characterization and Lipids Class Composition of Pomegranate Seeds. Biomed Res Int [Internet]. 2017;2017:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2037341/>
 63. Hashemi SMB, Mousavi Khaneghah A, Nikmaram N, Raeisi S, Rahman MS, Avallone S. Heating, microwave and UV irradiation effects on oxidative stability of Sardasht red grape (*Vitis vinifera* cultiv. Sardasht) seed oil. Int J Food Sci Technol [Internet]. 2017 Jun;52(6):1341–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.13421>
 64. Maszewska M, Florowska A, Dłużewska E, Wroniak M, Marciniak-Lukasiak K, Żbikowska A. Oxidative Stability of Selected Edible Oils. Molecules [Internet]. 2018 Jul 17;23(7):1746. Available from:

<http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1746>

65. Sabir A, Unver A, Kara Z. The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agric* [Internet]. 2012 Jul;92(9):1982–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5571>
66. Ma Z, Zhang H. Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants* [Internet]. 2017 Sep 15;6(3):71. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/6/3/71>
67. Taghvaei M, Jafari SM. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Mar 6;52(3):1272–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1080-1>
68. CODEX. SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources. FAO. 2017.
69. Davidov-Pardo G, McClements DJ. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem* [Internet]. 2015 Jan;167:205–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614009807>
70. Malićanin M, Rac V, Antić V, Antić M, Palade LM, Kefalas P, et al. Content of Antioxidants, Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of Grape Seed Oil Obtained by Ultra Sound Assisted Extraction. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 2014 Jun 28;91(6):989–99. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-014-2441-2>

71. Chambre DR, Tociu M, Stanescu MD, Popescu C. Influence of composition on the thermal behavior of oils extracted from the seeds of some Romanian grapes. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2019 Nov 8;99(14):6324–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.9909>
72. Zhang H, Zheng M, Shi J, Tang H, Deng Q, Huang F, et al. Enzymatic preparation of “functional oil” rich in feruloylated structured lipids with solvent-free ultrasound pretreatment. *Food Chem* [Internet]. 2018 May;248:272–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617320356>
73. Irandoost P, Ebrahimi-Mameghani M, Pirouzpanah S. Does grape seed oil improve inflammation and insulin resistance in overweight or obese women? *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 2013 Sep 19;64(6):706–10. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2013.775228>
74. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989 May;66(5):365-78.
75. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014 Aug 10;11(8):506–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>

76. FAO / WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Expert Consult report, Córdoba, Argentina. 2001;
77. Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2019 Aug 2;103(16):6463–72. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-019-09978-7>
78. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [Internet]. 2017 Sep 15;9(9):1021. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/1021>
79. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018 - Diário Oficial da União - Imprensa Nacional. Diário Oficial da União. 2018.
80. Tuo Y, Song X, Song Y, Liu W, Tang Y, Gao Y, et al. Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018 Jun;101(6):4822–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218302352>
81. Walsham ADS, MacKenzie DA, Cook V, Wemyss-Holden S, Hews CL, Juge N, et al. *Lactobacillus reuteri* Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence to Human Intestinal Epithelium. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Mar 1;7. Available from:

- <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00244>
82. Cavallini DC, Suzuki JY, Abdalla DS, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2011;10(1):126. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-10-126>
 83. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciências Farm* [Internet]. 2006 Mar;42(1):1–16. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 84. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* [Internet]. 2000 Dec;84(3):197–215. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600003758>
 85. Bengoa AA, Iraporda C, Acurcio LB, de Cicco Sandes SH, Costa K, Moreira Guimarães G, et al. “Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir.” *Food Res Int* [Internet]. 2019 Sep;123:48–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691930273X>
 86. Celiberto LS, Bedani R, Rossi EA, Cavallini DCU. Probiotics: The Scientific Evidence in the Context of Inflammatory Bowel Disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2015 May 21;00–00. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2014.941457>

87. Piatek J, Gibas-Dorna M, Olejnik A, Krauss H, Wierzbicki K, Zukiewicz-Sobczak W, et al. The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination - in vitro study. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(1):99–102.
88. Matsuoka K, Uemura Y, Kanai T, Kunisaki R, Suzuki Y, Yokoyama K, et al. Efficacy of *Bifidobacterium breve* Fermented Milk in Maintaining Remission of Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2018 Jul 15;63(7):1910–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-018-4946-2>
89. Tamaki H, Nakase H, Inoue S, Kawanami C, Itani T, Ohana M, et al. Efficacy of probiotic treatment with *Bifidobacterium longum* 536 for induction of remission in active ulcerative colitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial. *Dig Endosc* [Internet]. 2016 Jan;28(1):67–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/den.12553>
90. Peng L, Zhong Y, Wang A, Jiang Z. Probiotics combined with aminosalicilic acid affiliates remission of ulcerative colitis: a meta-analysis of randomized controlled trial. *Biosci Rep* [Internet]. 2019 Jan 31;39(1):BSR20180943. Available from: <http://bioscirep.org/lookup/doi/10.1042/BSR20180943>
91. Laličić-Petronijević J, Popov-Raljić J, Obradović D, Radulović Z, Paunović D, Petrušić M, 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. *J Funct Foods* [Internet]. 2015 May;15:541–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615001632>
92. Riboldi GP, Frazzon J, D'Azevedo PA, Frazzon APG. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in Southern Brazil. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2009 Mar;40(1):125–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000100021&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 93. Bedani R, Pauly-Silveira ND, Cano VSP, Valentini SR, Valdez GF de, Rossi EA. Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fed on a beef-based animal diet. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2011 Sep;42(3):1238–47. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000300050&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 94. Cavallini DC, Abdalla DS, Vendramini RC, Bedani R, Bomdespacho LQ, Pauly-Silveira ND, et al. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2009;8(1):40. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-8-40>
 95. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, De Oliveira MG, De Valdez GF. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. *Arch Latinoam Nutr*. 2003;53(1).

96. Celiberto LS, Bedani R, Dejana NN, Ivo de Medeiros A, Sampaio Zuanon JA, Spolidorio LC, et al. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. Smidt H, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Apr 24;12(4):e0175935. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0175935>
97. Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, Pauly ND, Carlos IZ, et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. Eur Food Res Technol [Internet]. 2008 Dec 1;228(2):231–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-008-0927-6>
98. Kinouchi FL, Maia DCG, de Abreu Ribeiro LC, Placeres MCP, de Valdez GF, Colombo LL, et al. A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. Food Chem Toxicol [Internet]. 2012 Nov;50(11):4144–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512006187>
99. Konar N, Toker OS, Oba S, Sagdic O. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2016 Mar;49:35–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300297>
100. Terpou A, Mantzourani I, Galanis A, Kanellaki M, Bezirtzoglou E, Bekatorou A, et al. Employment of *L. paracasei* K5 as a Novel Potentially

- Probiotic Freeze-Dried Starter for Feta-Type Cheese Production. *Microorganisms* [Internet]. 2018 Dec 26;7(1):3. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/3>
101. Ye Q, Georges N, Selomulya C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2018 Aug;78:167–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441830013X>
 102. Santaella N, Cerri MO, De Paula AV. Caracterização hidrodinâmica de um reator de leito fluidizado e determinação da velocidade mínima de fluificação em função da massa de biocatalisador. In: XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. São Carlos SP; 2017.
 103. Hamam F, Budge SM. Structured and Specialty Lipids in Continuous Packed Column Reactors: Comparison of Production Using One and Two Enzyme Beds. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 2010 Apr 1;87(4):385–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-009-1515-z>
 104. Amini Z, Ilham Z, Ong HC, Mazaheri H, Chen W-H. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Convers Manag* [Internet]. 2017 Jun;141:339–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890416308391>
 105. Al-Zuhair S, Almenhali A, Hamad I, Alshehhi M, Alsuwaidi N, Mohamed

S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils:
Design of a pilot plant. Renew Energy [Internet]. 2011 Oct;36(10):2605–
14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.05.010>

