



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA



Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
(Ciência dos Alimentos)

Desenvolvimento e caracterização de chocolate *diet* em barra
potencialmente probiótico

IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO

ARARAQUARA - SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
CÂMPUS DE ARARAQUARA



Desenvolvimento e caracterização de chocolate *diet* em barra potencialmente probiótico

IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Ciência dos Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

ARARAQUARA - SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C882d Cozentino, Izabela de Souza Correia
Desenvolvimento e caracterização de chocolate diet em barra potencialmente probiótico
/ Izabela de Souza Correia Cozentino – Araraquara, 2015
94 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

1. Chocolate. 2. Probiótico. 3. Chocolate diet. 4. Alimentos funcionais. 5.
Microencapsulação. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

**Desenvolvimento e caracterização de chocolate *diet* em barra
potencialmente probiótico**

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Bedani

Prof^ª. Dr^ª. Renata Tieko Nassu

ARARAQUARA - SP

2015

*Aos meus pais, minha irmã e meu marido
pelo incentivo e apoio constante em todos
os momentos de minha jornada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelos caminhos certos, abençoando minha vida.

A minha família, pelo apoio em todas as fases da minha vida.

A Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, por acreditar no meu trabalho e no meu potencial, por sua orientação e ensinamentos durante todos esses anos.

Aos meus amigos do Laboratório pelo companheirismo e ajuda no dia a dia de trabalho.

A Josiane, Jéssica, Mariana e Roseli pela contribuição no período experimental deste projeto.

As técnicas, do laboratório Roseli e Josiane, pelos ensinamentos, pela ajuda e treinamento oferecidos com as análises, pelas contribuições nestes anos de trabalho e também pelos conselhos profissionais e pessoais.

Ao Pesquisador Dr. Valdecir Luccas pelo suporte à pesquisa e disponibilização da planta piloto do Cereal Chocotec.

Aos funcionários e pesquisadores do Cereal Chocotec/Instituto de Tecnologia de Alimentos–ITAL, em especial a técnica Maria Angélica Razzé, pelo suporte à produção do chocolate e as análises.

Às empresas, Tate&Lyle, Labonathus, Barry Callebaut, Solae, Danisco e Tangará Foods, que colaboraram com o fornecimento de matérias-primas para a realização da pesquisa.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAR-UNESP, pelo aprendizado e experiência concedidos durante o curso de mestrado.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAR-UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Concessão de bolsa do mestrado.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões na etapa final deste trabalho.

A todos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação e da Biblioteca da FCFAR-UNESP.

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	10
GENERAL ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
<i>CAPÍTULO I</i>	16
CHOCOLATE: POTENCIAL PARA VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS .	17
RESUMO	17
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Chocolate.....	20
2.2 Chocolate diet.....	23
2.3 Processamento tradicional de chocolate.....	25
2.4 Probióticos.....	28
2.5 Encapsulação de probióticos	31
2.5.1 Coacervação	34
2.6 Chocolate como veículo para microrganismos probióticos.....	36
3 CONCLUSÃO	37
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
<i>CAPÍTULO II</i>	48
DESENVOLVIMENTO DE UM CHOCOLATE <i>DIET</i> EM BARRA POTENCIALMENTE PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DE <i>Enterococcus faecium</i> CRL183.....	49
RESUMO	49
ABSTRACT.....	50
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Material	53
2.2 Métodos.....	53

2.2.1	Preparação e avaliação da cultura probiótica	53
2.2.2	Elaboração do chocolate probiótico	55
2.2.3	Caracterização do chocolate probiótico	57
2.2.4	Avaliação <i>in vitro</i> da resistência gastrintestinal da cepa <i>E. faecium</i> CRL 183	60
2.2.5	Análise sensorial	61
2.2.6	Análise estatística dos resultados	61
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1	Viabilidade celular da cepa <i>E. faecium</i> CRL183 nas formas microencapsulada, microencapsulada e liofilizada e livre liofilizada, durante o armazenamento à temperatura ambiente	62
3.2	Caracterização morfológica das microcápsulas com cultura probiótica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	65
3.3	Caracterização físico-química do chocolate.....	66
3.3.1	Propriedades reológicas e granulometria	67
3.3.2	Índice de temperagem (<i>Temperíndex</i>).....	68
3.3.3	Composição centesimal.....	69
3.3.4	Determinação da atividade de água (<i>Aw</i>)	70
3.4	Caracterização microbiológica do chocolate.....	72
3.4.1	Segurança microbiológica	72
3.4.2	Determinação da viabilidade celular do microrganismo probiótico (<i>E. faecium</i> CRL 183) no chocolate	74
3.5	Avaliação <i>in vitro</i> da resistência gastrintestinal da cepa <i>E. faecium</i> CRL 183	77
3.6	Caracterização sensorial do chocolate.....	79
3.6.1	Análise sensorial	79
3.6.2	Teste de intenção de compra	82
4	CONCLUSÃO	85
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXOS.....	92
	Anexo 1. Modelo de ficha de avaliação sensorial das formulações.	93
	Anexo 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1- Formulação básica para a preparação do chocolate	56
Tabela 2-Viabilidade de <i>E. faecium</i> (log UFC/g) na forma microencapsulada, livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada, durante o período de armazenamento à temperatura ambiente.	64
Tabela 3- Caracterização reológica e tamanho máximo de partículas das formulações	67
Tabela 4- Teores médios da composição centesimal dos diferentes tratamentos de chocolate	69
Tabela 5- Teores médios de atividade de água (Aw) nas amostras de chocolate segundo formulações e tempo de armazenamento.....	71
Tabela 6- Resultados das análises microbiológicas dos diferentes tratamentos de chocolate..	73
Tabela 7- Viabilidade celular do microrganismo probiótico (<i>E. faecium</i> CRL 183) no chocolate, na forma livre liofilizada e microencapsulada liofilizada, durante o armazenamento a 25°C.	75
Tabela 8- Viabilidade do <i>Enterococcus faecium</i> (log UFC/g) presentes no chocolate durante exposição sequencial as condições gástricas e entéricas simuladas.	78
Tabela 9- Médias de aceitação de cada atributo avaliado nos diferentes tratamentos ao longo do período de armazenamento à 25°C (n=112).	81

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1- Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas liofilizadas produzidas por coacervação complexa contendo *E. faecium*. 66
- Figura 2- Distribuição da frequência das notas correspondentes à escala utilizada para avaliar a intenção de compra nos produtos prontos para o consumo (T0) e durante o período de armazenamento (T90 e T180 dias). 84

RESUMO GERAL

Atualmente, existe um interesse crescente no consumo de alimentos probióticos, em função dos seus efeitos benéficos para a saúde. Por outro lado, produtos *diet/light* também têm atraído a atenção dos consumidores, principalmente dos que são diabéticos, hipoglicêmicos, obesos e daqueles que desejam ter uma alimentação mais saudável. O chocolate destaca-se pelo sabor agradável, por seus benefícios já comprovados à saúde e por possuir características ideais para a veiculação de probióticos. No entanto, a maior crítica em relação ao consumo de chocolate é o seu alto teor calórico, resultado da presença de açúcares e gordura. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar um chocolate *diet* (sem adição de açúcar) em barra com adição da cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 nas formas livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada. A cepa probiótica foi microencapsulada pela técnica de coacervação complexa, utilizando-se pectina e caseína como materiais de parede. Antes de serem adicionadas ao chocolate, as microcápsulas foram avaliadas quanto à viabilidade do microrganismo probiótico. Os chocolates *diet* foram processados seguindo procedimentos tradicionais de fabricação e divididos em três tratamentos: I-chocolate em barra sem adição da cultura probiótica (controle); II-chocolate em barra com adição da cultura probiótica livre, liofilizada e III-chocolate em barra com adição da cultura probiótica microencapsulada, pela técnica de coacervação seguida de liofilização. A qualidade dos chocolates foi avaliada através de análises físico-químicas (composição centesimal, pH, atividade de água e propriedades reológicas), microbiológicas (viabilidade dos microrganismos probióticos e pesquisa de mesófilos totais, coliformes totais, clostrídios sulfito redutores, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e bolores e leveduras), sensoriais (teste de aceitação e teste de intenção de compra) e teste de resistência gastrointestinal *in vitro*. A técnica de coacervação complexa mostrou-se adequada para a microencapsulação do microrganismo probiótico, pois manteve a população de células viáveis superior a 7 log UFC/g (unidades formadoras de colônias por grama) durante 270 dias de armazenamento à temperatura ambiente. No final do período avaliado, a cepa probiótica na forma livre liofilizada também apresentou população de células viáveis superior a 7 log UFC/g, entretanto, verificou-se redução total de 3,5 ciclos logarítmicos ao longo do armazenamento, enquanto que para a forma microencapsulada e liofilizada a redução foi de apenas 1 ciclo logarítmico. Foi possível produzir um chocolate *diet* com adição da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 nas formas livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada, uma vez que os produtos apresentaram elevada viabilidade e estabilidade durante 180 dias de armazenamento à 25°C, independentemente do tratamento. Em relação à análise sensorial, os chocolates com adição do probiótico na forma livre liofilizada exibiram a melhor aceitação sensorial, principalmente em relação ao atributo textura. Os testes *in vitro* evidenciaram que o microrganismo probiótico nas formas livre e microencapsulada foi capaz de resistir às condições adversas do ambiente gastrointestinal. Entretanto, a microencapsulação por coacervação melhorou a resistência da cepa *E. faecium* CRL 183 na fase gástrica. Os resultados obtidos indicam que foi possível obter um chocolate potencialmente probiótico, para consumo à temperatura ambiente, dentro das normas microbiológicas e com qualidade sensorial satisfatória, contribuindo assim, para a diversificação dos produtos probióticos e oferecendo novas opções para o consumidor.

Palavras-chave: Chocolate. Probiótico. Chocolate *diet*. Alimentos funcionais. Microencapsulação.

GENERAL ABSTRACT

Nowadays, there is a growing interest in the consumption of probiotic foods due to its beneficial effects on health. On the other hand, diet/light products have been also attracting the attention of consumers, especially those who are diabetic, hypoglycemic, and obese, as well as those who wish to have a healthier diet. Thus, the chocolate stands out for the pleasant taste, for its health benefits and for carrying ideal characteristics for probiotic transmission. However, the most critics on chocolate consumption is due to its high caloric content, which results from the presence of sugar and fat. Hence, the objective of this study was to develop and characterize a *diet* chocolate (no added sugar) in bars with addition of a probiotic strain *Enterococcus faecium* CRL 183 in free lyophilized and microencapsulated and lyophilized forms. The probiotic strain was microencapsulated by complex coacervation technique, using pectin and casein as wall materials. Before being added to the chocolate, the microcapsules were evaluated in relation to the viability of probiotic microorganism. The *diet* chocolates were processed following traditional manufacturing procedures and divided into three treatments: I-chocolate bar without adding probiotic culture (control); II-chocolate bar with the addition of free probiotic culture, lyophilized and III-chocolate bar with the addition of microencapsulated probiotic culture, coacervation technique followed by lyophilization. The quality of the chocolates was evaluated by physical-chemical analysis (chemical composition, pH, water activity and rheological properties), microbiological (viability of probiotic microorganisms and mesophile bacteria, total coliforms, sulphite-reducing clostridia, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and molds and yeasts), sensory (test of acceptance and purchase intention test) and resistance testing to *in vitro* gastrointestinal fluids. The complex coacervation technique has proven to be suitable for probiotic microencapsulation since it yielded viable cells population greater than 7 log CFU/g during 270 days of storage at room temperature. At the end of the testing period, the probiotic strain in lyophilized free form also showed viable cells population greater than 7 log CFU/g, however, it was found an overall reduction of 3.5 log cycle during storage, whereas for the microencapsulated and lyophilized form the reduction was only 1 log cycle. It was possible to produce a diet chocolate with added probiotic strain *E. faecium* CRL 183 in microencapsulated and free lyophilized and lyophilized forms, since the products presented high viability and stability during 180 days of storage at 25°C, regardless the treatment type. Regarding sensory analysis, the chocolates with addition of probiotic in lyophilized free form exhibited better sensory acceptance, especially regarding the texture attribute. The *in vitro* tests evidenced that the probiotic microorganism in free and microencapsulated form was able to withstand adverse conditions of the gastrointestinal environment. However, microencapsulation by coacervation improved the resistance of the strain *E. faecium* CRL 183 in the gastric phase. The results obtained in this research indicate that it was possible to obtain a potentially probiotic chocolate for consumption at room temperature, within microbiological standards and with satisfactory sensory quality, thus contributing to the diversification of probiotic products, as well as offering new options for consumers.

Keywords: Chocolate. Probiotic. *Diet* chocolate. Functional foods. Microencapsulation.

1 INTRODUÇÃO

O chocolate é um produto em franca expansão no mercado brasileiro e reconhecido por suas propriedades sensoriais e por seus benefícios à saúde (ABICAB, 2011). Por outro lado, a preocupação e o interesse dos consumidores com relação à manutenção da saúde e o envelhecimento saudável, impulsionou o desenvolvimento de chocolates com redução na concentração de sacarose e gordura (*diet e/ ou light*). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o termo *light* é uma alegação nutricional complementar que indica que o alimento sofreu redução de pelo menos 25% de determinado constituinte (valor energético, açúcares, gorduras totais, gorduras saturadas, colesterol e sódio), em comparação ao alimento convencional. Por outro lado, o termo *diet* é utilizado em algumas categorias de alimentos para fins especiais como: dietas com restrição de nutrientes, alimentos para controle de peso e alimentos para ingestão controlada de açúcares (ANVISA, 2012).

A substituição da sacarose por outros edulcorantes não calóricos possibilitou a obtenção do chocolate *diet*, com o objetivo de atender consumidores diabéticos, hipoglicêmicos, obesos e aqueles que almejam uma alimentação mais saudável (GOMES et al., 2007).

Uma forma de oferecer um produto inovador, nutritivo e com benefícios à saúde, satisfazendo assim as necessidades dos consumidores, seria agregar valor funcional ao chocolate, através da adição de microrganismos probióticos e/ou substâncias prebióticas (MOREIRA et al., 2010).

Os alimentos contendo microrganismos probióticos são populares devido aos efeitos benéficos atribuídos ao seu consumo, porém, esse mercado ainda é dominado pelos produtos lácteos, como iogurtes, leites fermentados e sobremesas (SAAD, 2006). O desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos merece atenção especial, pois deve garantir a manutenção da atividade e a viabilidade das células durante o armazenamento, uma vez que, a maioria desses produtos é mantida à temperatura ambiente (NEBESNY et al., 2007). Nesse sentido, a microencapsulação tem sido utilizada como uma forma de aumentar a resistência dos microrganismos probióticos durante as diferentes etapas de produção e armazenamento e ampliar suas aplicações em diferentes tipos de alimentos (MAILLARD; LANDUYT, 2008), além de auxiliar na manutenção da viabilidade das cepas durante a passagem pelo trato gastrintestinal (MARTÍN et al., 2015; SABIKHI et al., 2010).

Estudos realizados por pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Probióticos (FCF – UNESP – Araraquara) mostraram que a cepa *Enterococcus faecium* CRL 183 apresenta

efeitos benéficos à saúde, comprovados em estudos *in vitro*, em animais e em estudos clínicos (BEDANI et al., 2011; CAVALLINI et al., 2009; MIGUEL; ROSSI, 2003; ROSSI et. al., 2003). Os resultados obtidos indicam que a cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 apresenta capacidade de modulação do perfil lipídico, da microbiota intestinal (BEDANI, 2008; CAVALLINI et al, 2011) e redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (SIVIERI et al., 2008) e mama (KINOUCI, 2006). Na grande maioria dos estudos citados anteriormente, o microrganismo probiótico foi utilizado como cultura iniciadora em produtos à base de soja, indicando a necessidade de estudos visando a possibilidade de aplicação da mesma cepa probiótica em diferentes alimentos.

Diante das considerações acima, mostra-se oportuno o desenvolvimento de um chocolate em barra, isento de sacarose, com adição da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 microencapsulada. Destacamos que, até o presente momento, não existe disponível no mercado brasileiro, chocolates em barra com adição de microrganismos probióticos e a realização desse estudo proporcionou o desenvolvimento de um novo produto probiótico, com forte apelo frente ao mercado consumidor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento e a caracterização de um chocolate *diet* em barra, com adição da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 nas formas livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada, utilizando a coacervação complexa como técnica de encapsulação.

2.2 Objetivos específicos

Primeira etapa:

- Avaliar a eficiência do processo de microencapsulação por coacervação complexa seguido de liofilização da cepa probiótica de *Enterococcus faecium* CRL 183.
- Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probiótico por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Segunda etapa:

- Elaborar e realizar a caracterização microbiológica, físico-química e sensorial do chocolate *diet* em barra potencialmente probiótico.
- Determinar a resistência gastrointestinal do microrganismo probiótico no produto.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB (Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados). Disponível em < <http://www.abicab.org.br/>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. *Diário Oficial da União*, 13 nov., 2012.

BEDANI, R. **Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

BEDANI, R. et al. Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fed on a beef-based animal diet. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.42, n.3, p. 1238-1247, 2011.

CAVALLINI, D. C. U. et al. Effect of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol- fed rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.1, p.1, 2009.

CAVALLINI, D. C. U. et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 126, 2011.

GOMES C. R. et al. Influência de diferentes agentes de corpo nas características reológicas e sensoriais de chocolates *diet* em sacarose e *light* em calorias. **Revista Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 614-623, 2007.

KINOCHI, F.L. **“Iogurte” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama**. 2006. 85f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MAILLARD, M.; LANDUYT, A. Chocolate: an ideal carrier for probiotics. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 19, n. 3, p. 13-15, 2008.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p.15-25, 2015.

MIGUEL, D. P.; ROSSI, E. A. Viabilidade de bactérias ácido láticas em sorvetes de iogurte durante o período de estocagem. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 93-96, 2003.

MOREIRA, R. W. M. et al. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, n. 4, p. 435-438, 2010.

NEBESNY, E. et al. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research and Technology**, v. 225, n.1, p.33-42, 2007.

ROSSI, E. A. et al. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lipídeos séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, v. 53, n.1, p. 47-51, 2003.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SABIKHI, L.; BABU, B.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 586-593, 2010.

SIVIERI, K. et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male wistar rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 231-237, 2008.

CAPÍTULO I

CHOCOLATE: POTENCIAL PARA VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

RESUMO

A conscientização e interesse dos consumidores em relação a uma alimentação mais saudável têm impulsionado o desenvolvimento de alimentos que promovam benefícios à saúde e redução do risco de doenças. Os alimentos contendo microrganismos probióticos têm sido amplamente estudados, principalmente os derivados do leite, porém, o consumo destes produtos pode ser limitado, devido principalmente ao grande número de indivíduos que são intolerantes à lactose ou alérgicos à proteína do leite, à necessidade de refrigeração e por possuírem uma vida de prateleira relativamente curta. Nesse sentido, o desenvolvimento de produtos probióticos não-lácteos constitui uma alternativa para a diversificação do mercado de alimentos funcionais. Os chocolates apresentam bom potencial para veiculação de microrganismos probióticos, uma vez que possuem consistência mais sólida e maior teor de gordura, facilitando a manutenção da viabilidade do microrganismo durante as etapas de produção e armazenamento, além de apresentarem em sua composição substâncias antioxidantes, como os polifenóis, que agregam valor funcional ao produto. A maior dificuldade encontrada para incorporação de probióticos em diferentes tipos de alimentos está relacionada à capacidade de sobrevivência das células durante o armazenamento do produto e a passagem pelo trato gastrointestinal. Diferentes técnicas de microencapsulação têm sido utilizadas como uma forma de aumentar a resistência dos microrganismos probióticos e ampliar suas aplicações em diferentes tipos de alimentos. Considerando a necessidade crescente de desenvolvimento de alimentos capazes de conferir benefícios à saúde do consumidor, o objetivo desse capítulo foi revisar a importância do chocolate como um alimento funcional e um potencial veículo para microrganismos probióticos, em suas diferentes formas.

Palavras-chave: Chocolate. Probiótico. Alimentos funcionais. Microencapsulação.

CHOCOLATE: POTENTIAL VEHICLE FOR CARRYING PROBIOTICS MICROORGANISM

ABSTRACT

The awareness and interest of consumers towards a healthier diet have motivated the development of foods that promote health benefits and the reduction of disease risks. The foods containing probiotic microorganisms have been extensively studied, mainly milk-derived. However, the consumption of these products may be limited, primarily due to the large number of individuals that are lactose intolerant or allergic to milk protein, the need of refrigeration and because of the relatively short shelf life. In this sense, the development of non-dairy probiotic products has been an alternative for the diversification of functional foods market. The chocolate present a potential vehicle for carrying probiotics microorganism since present greater solid consistency and higher fat content, easing the maintenance of the viability of microorganism during production and storage steps. Also, the chocolates present antioxidants in their composition such as polyphenols, which add functional value to the product. The greatest difficulty in incorporating probiotics in different types of foods is related to the viability of the cells during product storage and passage through the gastrointestinal tract. Various microencapsulation techniques have been used to increase the resistance of the probiotic microorganisms and expand its applications in various types of foods. Considering the increasing need for food development capable provide health benefits for the consumer, the aim of this chapter to review the importance of the chocolate as a functional food and potential vehicle for probiotic microorganisms, in its different forms.

Keywords: Chocolate. Probiotic. Functional foods. Microencapsulation.

1 INTRODUÇÃO

O chocolate cria uma série de estímulos que ativam os centros de prazer no cérebro humano, contribuindo para que seja um dos alimentos mais populares e consumidos no mundo (LALICIC'-PETRONIJEVIC'et al., 2015). Apesar de possuir alto teor de gordura e açúcar, o consumo do chocolate contribui positivamente para a saúde humana (CHETANA et al., 2013), por apresentar em sua composição substâncias antioxidantes como os polifenóis, em especial os flavonóides (epicatequinas, catequinas e procianidinas) (ERDEM et al., 2014; JUARISTI et al., 2011; LATIF, 2013; RICHTER; LANNES, 2007). Estes flavonóides diminuem o risco de doenças cardiovasculares, melhoram os efeitos causados pelos radicais livres, possuem efeito anti-plaquetário e atividade imunoreguladora, além de atuarem como agentes vasoativos (ELLAM; WILLIAMSON, 2013; SCHMITZ et al., 2001; VISIOLI et al., 2009). Devido à presença de cacau, o chocolate também contém minerais, como potássio, fósforo, cobre, ferro, zinco e magnésio (CHETANA et al., 2013; LATIF, 2013; RICHTER; LANNES, 2007).

A crescente demanda por alimentos funcionais tem impulsionado a indústria de alimentos a inovar e desenvolver novos produtos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; COMAN et al., 2012). Nesse contexto, os alimentos probióticos se destacam por seus inúmeros benefícios como: aumento da resistência contra patógenos, modulação do sistema imune e do perfil lipídico (FULLER, 1989; MENEZES et al., 2012; SAAD, 2006; SAARELA, 2000); redução do desenvolvimento de câncer e alívio dos sintomas de doenças inflamatórias intestinais e de diarreias (PEREIRA et al., 2011; PIATEK et al., 2012).

Os microrganismos probióticos são normalmente incorporados em uma variedade de produtos lácteos, incluindo: bebidas lácteas fermentadas, iogurtes, queijos e sobremesas. Tais produtos são armazenados sob refrigeração, facilitando a manutenção da viabilidade do microrganismo (LALICIC'-PETRONIJEVIC'et al., 2015; POSSEMIERS et al., 2010; RANADHEERA et al., 2010).

Uma alternativa para melhorar a resistência das cepas probióticas seria a utilização de uma matriz alimentar, que possua naturalmente propriedades protetoras (POSSEMIERS et al., 2010). Os chocolates apresentam bom potencial para veiculação de microrganismos probióticos devido a características como pH mais elevado, boa capacidade de tamponamento, consistência mais sólida e maior teor de gordura, facilitando a manutenção da viabilidade do microrganismo durante as etapas de produção e armazenamento (MANDAL et al., 2012).

Outra forma de proteger a célula probiótica de possíveis danos durante o processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal é a utilização da técnica de microencapsulação, que consiste em recobrir partículas ou pequenas gotas de material líquido ou gasoso, formando cápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob condições específicas e taxas controladas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

A produção de chocolates com adição de microrganismos probióticos microencapsulados pode aumentar a resistência das cepas e potencializar os seus efeitos benéficos (BURGAIN et al., 2011; MAILLARD; LANDUYT, 2008; PIATEK et al., 2012; SABIKHI et al., 2010; VILLENA et al., 2009). Ademais, o desenvolvimento de chocolates com adição de cepas probióticas e ausência de sacarose, tende a ser mais atraente para o mercado consumidor, especialmente para indivíduos portadores de diabetes, hipoglicemia, obesos e aqueles que almejam uma alimentação mais saudável (GOMES et al., 2007). Considerando o exposto, o objetivo desse capítulo foi revisar a importância do chocolate como um alimento funcional e potencial veículo para microrganismos probióticos, em suas diferentes formas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Chocolate

Os povos da América Central foram os primeiros a cultivar os grãos de cacau, frutos do cacauzeiro, uma árvore nativa da região. Em função dos efeitos benéficos à saúde relacionados ao seu consumo, o chocolate foi considerado a bebida dos deuses e essa associação deu origem ao nome científico da planta: *Theobroma cacao* (Theo = Deus e broma = bebida) (LATIF, 2013). A bebida era conhecida como “chocolatl”: uma bebida fria e espumante, com gosto amargo e sabor picante, restrita a nobreza, por possuir poderes afrodisíacos. Com o tempo assumiu um papel de destaque, em substituição ao café e chá, na maioria dos países desenvolvidos (BECKETT, 1994; LATIF, 2013; MINIFIE, 1985; VERNA, 2013). As sementes de cacau, além de serem valorizadas pela produção da bebida “chocolatl”, também foram usadas como moeda no século 16 (BECKETT, 1994; VERNA, 2013).

Antigamente, a confecção do chocolate era realizada pela prensagem das amêndoas de cacau, com adição de água fria, mel ou açúcar, para obtenção de uma consistência espumosa. Posteriormente, o seu consumo foi difundido pela Europa, onde sofreu modificações na forma de preparo, tornando-o mais suave. Durante o processo, obtém-se uma massa, constituída de três componentes principais: líquido de cacau, manteiga de cacau e o resíduo do pó de cacau. A mistura destes componentes é a base para a fabricação de barras de chocolate e dos diferentes tipos de chocolates existentes no mercado (BECKETT, 1994; VALENZUELA, 2007).

A legislação brasileira define o líquido de cacau (massa ou pasta de cacau) como o produto obtido das amêndoas de cacau por processo tecnológico seguro para a produção de alimentos (ANVISA, 2005). A manteiga e o pó de cacau são produtos obtidos da massa (líquor) das amêndoas de cacau (ANVISA, 2005; BECKETT, 1994).

Considerado como um produto de luxo, o chocolate cria uma série de estímulos que ativam os centros de prazer no cérebro humano, o que o torna um dos alimentos mais populares e consumidos no mundo (LALICIC´-PETRONIJEVIC´et al., 2015). O sabor do chocolate é determinado parcialmente pela composição química do produto, variando em função da liberação dos compostos aromáticos, já a textura depende da maneira como o material se funde e quebra na boca (RICHTER; LANNES, 2007).

Hoje em dia, a planta de cacau é cultivada em vários países, principalmente, Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria, Camarões, Equador, República Dominicana, Papua Nova Guiné e Brasil (VERNA, 2013).

De acordo com a Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005, o chocolate é definido como “um produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (ou pasta ou líquido) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% (g/100 g) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados” (ANVISA, 2005).

O chocolate não é apenas uma mistura simples de gordura e açúcar, mas também se caracteriza por apresentar em sua composição substâncias antioxidantes como os polifenóis, em especial os flavonóides (epicatequinas, catequinas e procianidinas), em concentração superior à encontrada em outros alimentos como vinho tinto, chá verde e maçã (ERDEM et al., 2014; JUARISTI et al., 2011; LATIF, 2013; RICHTER; LANNES, 2007). Estes flavonóides reduzem o risco de doenças cardiovasculares e os efeitos causados pelos radicais livres, possuem ação anti-plaquetária e atividade imunoreguladora, além de atuarem como

agentes vasoativos (ELLAM; WILLIAMSON, 2013; SCHMITZ et al., 2001; VISIOLI et al., 2009).

A quantidade de flavonóides nos produtos de cacau e no chocolate industrializado é dependente da colheita dos frutos, dos processos realizados em campo (fermentação e secagem) e das condições dos processos subsequentes usados pelos fabricantes de chocolate (DILLINGER et al., 2000). Os flavonóides do chocolate são facilmente destruídos pelo calor e por inúmeras outras condições comuns ao processo de colheita do cacau e fabricação do chocolate, portanto, deve haver um enorme cuidado pelo fabricante para preservar os teores naturalmente existentes de flavonóides, garantindo assim, que permaneçam em quantidades adequadas nos produtos finais (SCHMITZ et al., 2001).

O chocolate é composto ainda, de manteiga de cacau, que contém ácido oléico, ácido palmítico e ácido esteárico; minerais como potássio, fósforo, cobre, ferro, zinco e magnésio e compostos nitrogenados (LATIF, 2013; RICHTER; LANNES, 2007).

Com o passar dos anos, o chocolate foi sendo reconhecido por suas propriedades sensoriais e pelos benefícios à saúde que incluem: redução do risco de doenças cardiovasculares e inibição da multiplicação de células tumorais (RICHTER; LANNES, 2007). O efeito protetor em relação às doenças cardiovasculares está associado à inibição da oxidação lipídica, controle da pressão arterial e do ganho de peso, inibição da ativação de plaquetas e produção de neurotransmissores que atuam no controle do estresse. (BUIJSSE et al., 2006; FRANCIS et al., 2006; GRASSI et al., 2005a; GRASSI et al., 2005b; HERMANN et al., 2006; LARSSON et al., 2012; MARTIN et al., 2009; MATSUI et al., 2005; NURK et al., 2009; PEARSON et al., 2002; REIN et al., 2000; SCHRAMM et al., 2001; TAUBERT et al., 2003; ZOMER et al., 2012; WALTERS et al., 2012; WISWEDEL et al., 2004).

Nos Estados Unidos, o consumo per capita de chocolate é de 5,18kg por ano, e os países desenvolvidos respondem por cerca de 64% do consumo mundial de chocolates (KATZ et al., 2011). No Brasil, o chocolate é considerado um produto em expansão, sendo que a sua produção teve um crescimento de 5,4% no ano de 2011 em relação ao ano de 2010 (ABICAB, 2011). Ainda de acordo com a Abicab (Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e derivados), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de chocolates, ficando atrás dos Estados Unidos e da Alemanha e considerado o quarto maior consumidor de chocolate do mundo, com uma produção de 228.212 toneladas no primeiro semestre de 2012, 4,2% superior ao mesmo período de 2011.

A maior crítica em relação ao consumo de chocolates é o seu elevado teor calórico, resultado da presença de altas concentrações de açúcares e gordura no produto (LATIF,

2013). Uma forma de amenizar essa desvantagem é a produção de chocolates com redução nos teores de açúcares e gordura (chocolates *diet* e/ ou *light*).

2.2 Chocolate *diet*

A crescente demanda por alimentos saudáveis e a conscientização de que uma alimentação mais saudável está diretamente relacionada à manutenção da saúde do indivíduo, tem estimulado a indústria de alimentos a inovar e desenvolver novos produtos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Atualmente, exige-se ainda mais dos alimentos, pois além de não fazerem mal à saúde e fornecerem nutrientes essenciais, devem conferir propriedades de saúde adicionais (RAUD, 2008).

Os primeiros estudos científicos em 1960 comprovaram a ligação entre alimentação e saúde, apontando para os impactos negativos do excesso de gordura e açúcar. Os produtos *diet* e *light* começaram a ser comercializados com sucesso na década de 1980, com o objetivo de atender consumidores diabéticos, hipoglicêmicos, obesos e aqueles que almejam uma alimentação mais saudável (GOMES et al., 2007; RAUD, 2008).

Alimentos *light* são definidos como produtos que tenham uma redução mínima de 25% no valor energético total, ou na quantidade de açúcares, gorduras (totais ou saturadas), proteínas e sódio. No caso específico de alimentos com redução no teor de açúcares, o valor absoluto da diferença, em comparação com o alimento convencional, deve ser de no mínimo 5g por porção. Caso o alimento não atenda às condições estabelecidas para o atributo “baixo ou reduzido em valor energético” deve ser declarado no rótulo, juntamente com a informação nutricional complementar (INC) “Este não é um alimento baixo ou reduzido em valor energético” (ANVISA, 2012). Chocolates *light* podem ser desenvolvidos através da diminuição do teor de gordura. Entretanto, quando a concentração de gordura for menor que 27% de seu peso, o chocolate perde a sua suavidade e capacidade de derretimento na boca, sendo necessária a adição de ingredientes substitutos de gordura (NEBESNY, ZYZELEWICZ, 2005).

Segundo a legislação brasileira, alimentos *diet* são aqueles utilizados para dietas com restrição de algum nutriente como, carboidrato (sacarose, frutose e ou glicose), gordura e proteína, sendo especialmente formulados para atender às necessidades de pessoas com distúrbios no metabolismo desses nutrientes. A maior parte dos chocolates sem adição de açúcares (ou *diet* em açúcar) utilizam uma variedade de edulcorantes artificiais ou naturais,

como substitutos da sacarose, com o objetivo de preservar o sabor e a textura do chocolate tradicional (VISIOLI et al., 2009).

A legislação brasileira regula o uso de edulcorantes naturais e artificiais estabelecendo seus limites máximos. Os naturais são: sorbitol, xarope de sorbitol, D-sorbita; manitol; isomalt (isomaltitol); glicosídeos de esteviol; maltitol, xarope de maltitol; lactitol; xilitol e eritritol. Os artificiais incluem: acesulfame de potássio; aspartame; ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio; sacarina e seus sais de cálcio, potássio e sódio; sucralose; taumatina e neotame (ANVISA, 2008a).

Entidades governamentais de muitos países têm alertado os consumidores em relação à ingestão de alimentos com excesso de açúcar, um dos grandes responsáveis por doenças cardiovasculares, obesidade, cárie dentária e diabetes (PARPINELLO et al., 2001). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que pelo menos 346 milhões de pessoas no mundo são portadoras de diabetes, sendo que este número pode dobrar até 2030. O órgão alerta ainda, que 80% das mortes provocadas pela doença são em países de média e baixa renda (OMS, 2013). O censo do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em 2010 evidencia que no Brasil existem cerca de 12 milhões de pessoas acometidas pela doença (IBGE, 2010).

Durante a digestão, carboidratos como a sacarose, a lactose e o amido são quebrados em açúcares simples que são transportados por corrente sanguínea a todas as células do corpo. O *Diabetes mellitus* é caracterizado pela dificuldade do organismo em metabolizar os açúcares ingeridos, já que seus portadores não produzem insulina suficiente ou não podem usar a insulina produzida (AZUCAR, 1999). Pessoas que sofrem de distúrbios metabólicos, como *Diabetes mellitus* ou obesidade, não devem consumir chocolate nem outros produtos com alto teor de sacarose e gordura (NEBESNY et al., 2005; PARPINELLO et al., 2001).

No caso específico do chocolate *diet*, a substituição da sacarose por edulcorantes de alta intensidade e/ ou edulcorantes de baixa intensidade, possibilita a obtenção de um produto que poderia ser consumido por indivíduos que apresentam restrição na ingestão de açúcares (NEBESNY et al., 2007). No entanto, a substituição da sacarose por outros edulcorantes pode causar prejuízo sensorial ao produto (GOMES et al., 2007).

Para confecção do chocolate *diet*, além da adição dos edulcorantes de alta intensidade, é crucial a adição da pasta de cacau, manteiga de cacau, leite em pó e de edulcorantes de baixa densidade como o manitol, maltitol, xilitol, frutose e sorbitol, que atuam como agentes de corpo (RICHTER; LANNES, 2007). As formas cristalinas anidras de polióis (isomalte,

maltitol e lactitol) são mais fáceis de trabalhar do ponto de vista de processo (NEBESNY, ZYZELEWICZ, 2005).

O grande desafio da indústria alimentícia voltada à produção de chocolates *diet* consiste em desenvolver um produto com características de sabor e aparência semelhantes às dos chocolates tradicionais, com adição de sacarose. Para isto, os ingredientes utilizados não podem alterar as propriedades sensoriais do produto e devem apresentar boa estabilidade durante todas as etapas de produção (OLINGER, 1995).

2.3 Processamento tradicional de chocolate

Embora o chocolate seja basicamente uma mistura uniforme de cacau, manteiga de cacau e açúcar, seu processo de produção envolve várias etapas controladas: mistura, refino, conchagem, temperagem, moldagem e embalagem (ERDEM et al., 2014). Para a *Food and Agriculture Organization* (FAO) os procedimentos mais importantes para obtenção do chocolate são: torrefação dos grãos de cacau, conchagem, resfriamento e temperagem (FAO, 2001). As principais etapas do processo utilizado para a produção de chocolates são descritas abaixo.

Mistura e refino

Segundo Beckett (1994), após a fermentação ocorre à torrefação dos grãos de cacau, que consiste em homogeneizar os compostos sólidos para a obtenção de uma pasta uniforme, com granulometria controlada. É um processo aplicado a muitos alimentos como uma forma de desenvolver sabor (MINIFIE, 1985).

A pasta é então passada por um refinador com cinco rolos para a obtenção de uma massa uniforme (BECKETT, 1994). O refino da pasta do chocolate é uma operação importante e produz a textura lisa tão desejável em produtos de confeitaria (MINIFIE, 1985). O objetivo desta etapa é que as partículas de cacau sólido, o açúcar e qualquer sólido do leite sejam quebrados, para que se tornem suficientemente pequenos para não serem percebidos pela língua. O tamanho real depende do tipo de chocolate e do mercado no qual ele será vendido, porém, em geral, a grande maioria das partículas deve permanecer entre 20-25µm (BECKETT, 1994). O processo de refino deve criar um tamanho adequado de partículas, já que elas influenciam os processos reológicos e sensoriais do chocolate (KONAR et al., 2014).

Conchagem

Na conchagem, o produto já refinado é submetido à agitação com temperatura controlada durante um longo tempo, para eliminação de compostos voláteis indesejáveis e desenvolvimento de sabores agradáveis (BECKETT, 1994). Nessa etapa ocorre o desenvolvimento do sabor por meio de cisalhamento e aquecimento, eliminação de umidade e homogeneização. A conchagem ocorre à temperatura de 60°C em um prolongado período de tempo, normalmente de 12 a 24 horas (BECKETT, 1994; MINIFIE, 1985). As variações nos tempos e temperaturas da conchagem podem modificar a viscosidade, textura e sabor do chocolate (KONAR et al., 2014). O tempo de conchagem é diretamente relacionado à formação de compostos aromáticos desejáveis no produto final, sendo considerado um processo essencial para o desenvolvimento do sabor e da textura do chocolate (BECKETT, 1994; MINIFIE, 1985).

Temperagem

A manteiga de cacau, devido a sua natureza polimórfica, pode cristalizar-se em diferentes formas, sendo as formas α e γ consideradas instáveis e as formas β estáveis (YANO; SATO, 1999). A temperagem consiste em uma cristalização controlada, através de tratamentos térmicos e mecânicos, para produzir uma porcentagem específica de cristais da forma mais estável da manteiga de cacau. Esta forma está associada a níveis de brilho elevados e maior contração de volume, que leva a boas características de consistência, ideal para a retirada dos moldes (SUBRAMANIAN; MURPHY, 2001). A cristalização adequada ajuda a estabilizar as transições polimórficas de cristais da manteiga de cacau durante o armazenamento, fornecendo a aparência lisa e brilhante do chocolate (BECKETT, 1994; ERDEM et al., 2014).

Na temperagem o chocolate é aquecido a temperaturas de 40-45°C, até derretimento da fase gordurosa, com posterior resfriamento sob agitação constante. Nesse processo ocorre a formação de cristais estáveis e instáveis, sendo necessário novo aquecimento à temperatura mais baixa, para que somente as formas instáveis sejam fundidas (COHEN et al., 2004).

Moldagem e resfriamento

Moldagem e resfriamento são etapas em que o chocolate fundido é depositado em moldes, que sofrem vibrações, através de uma mesa ou esteira vibratória, para acomodação do chocolate e liberação de bolhas de ar e então, são resfriados em um túnel de resfriamento a uma temperatura de 6 a 10°C até a fase gordurosa atingir um grau de cristalização adequado (COHEN et al., 2004). O objetivo da etapa de resfriamento é continuar a cristalização da manteiga de cacau na forma β (mais estável) no chocolate. O correto resfriamento do chocolate é importante também para evitar a formação do *fat bloom* durante o armazenamento (SUBRAMANIAN; MURPHY, 2001).

O *fat bloom* é um defeito físico que aparece durante o armazenamento do chocolate, resultando na formação de cristais de gordura na superfície do produto, dando uma aparência esbranquiçada ou acinzentada. Embora as alterações físicas associadas ao *fat bloom* sejam bem conhecidas, estando relacionadas às formas cristalinas da manteiga de cacau, seu mecanismo de formação é ainda incerto (AFOAKWA et al., 2009; LOISEL et al., 1997). A literatura indica que o *fat bloom* ocorre devido à migração da fração líquida da gordura da matriz do chocolate e sua gradual recristalização não controlada na superfície. Esta recristalização é caracterizada ou acompanhada por uma transição polimórfica de uma fase menos estável para outra mais estável (LOISEL et al., 1997).

O armazenamento em ambientes quentes e uma temperagem inadequada também podem provocar este problema tecnológico muito comum na indústria de chocolate, reduzindo a aparência lisa e brilhante do produto. O *fat bloom* causa perdas de produto, devido, principalmente, às alterações nas características sensoriais relacionadas à aparência, influenciando negativamente a atitude de compra do consumidor (FUHRMAN, 2004). A característica principal do chocolate, que deve ser definida durante a produção, é o ponto de fusão à temperatura do corpo humano, que garante o derretimento adequado do produto na cavidade oral (NEBESNY et al., 2007).

Desmoldagem e embalagem

Ao saírem do túnel de resfriamento, as barras são desenformadas e os chocolates embalados para posterior armazenamento e comercialização (RICHTER; LANNES, 2007).

2.4 Probióticos

Uma das primeiras definições de probióticos foi proposta por Fuller (1989). Segundo esse pesquisador, probióticos eram definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que agem no trato gastrointestinal, mantendo ou melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal. Estes microrganismos precisam ser administrados em uma quantidade adequada para conferir benefícios à saúde. Entretanto, a definição aceita internacionalmente é que são microrganismos vivos que, quando administrados em doses apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (CUNHA et al., 2008; FAO/WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2001; HILL et al., 2014; SAAD, 2006).

Segundo a ANVISA, o número mínimo de células viáveis, necessário para que os efeitos benéficos sejam observados, situa-se na faixa de 10^8 a 10^9 UFC por porção diária recomendada do produto, pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove a sua eficácia (ANVISA, 2008b).

Para que um microrganismo seja considerado probiótico este deve sobreviver às diferentes etapas de processamento, às condições de armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal, sendo capaz de colonizar, ao menos temporariamente o intestino (MANDAL et al., 2012; MENEZES et al., 2012).

Inúmeros são os benefícios que os probióticos podem proporcionar à saúde, como: aumento da resistência contra os patógenos, por efeitos antagônicos contra grupos específicos de organismos e competição por nutrientes; modulação do sistema imune e do perfil lipídico (CAVALLINI et al., 2011; FULLER, 1989; MENEZES et al., 2012; SAAD, 2006; SAARELA, 2000); redução do desenvolvimento de câncer e alívio dos sintomas de doenças inflamatórias intestinais e de diarreias (CELIBERTO et al., 2015; PEREIRA et al., 2011; PIATEK et al., 2012).

Considerando que os efeitos dos probióticos são cepa-dependentes (LALICIC´-PETRONIJEVIC´ et al., 2015), a etapa de seleção de cepas é decisiva para que os efeitos benéficos à saúde sejam observados e para atender às necessidades da população alvo do produto (KOMATSU et al., 2008).

Os gêneros de microrganismos mais utilizados como probióticos são *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., em função dos efeitos benéficos comprovados em modelos *in vitro* e *in vivo* e da segurança para o consumo humano. A ANVISA permite a alegação de propriedade de saúde para as seguintes espécies de microrganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*,

Lactobacillus casei variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008b).

Enterococcus spp. é um gênero de bactérias Gram-positivas, composto por 16 espécies que se multiplicam e sobrevivem em condições adversas. Algumas espécies pertencentes a esse gênero estão relacionadas à melhora nas propriedades sensoriais de alimentos, estando envolvidas no processo de maturação e realce do sabor de queijos e salsichas (LARENAS, 2002; RIBOLDI et al., 2009). Entre os benefícios de se utilizar a cepa *E. faecium* em alimentos fermentados estão a sua capacidade de inibir o desenvolvimento de patógenos de origem alimentar presentes nesse tipo de produto, bem como sua tolerância ao baixo pH, cloreto de sódio e nitrito (BARBOSA et al., 2014).

Cepas específicas de *Enterococcus* spp. principalmente às pertencentes a espécie *Enterococcus faecium*, são consideradas probióticas por melhorar o equilíbrio microbiano do trato gastrintestinal e exercerem outros efeitos benéficos à saúde (CAVALLINI et al., 2011; LARENAS, 2002; RIBOLDI et al., 2009). Vários trabalhos utilizaram, com sucesso, cepas de *E. faecium* como culturas probióticas (AHMADOVA et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; GARDINER et al., 1999; SAAVEDRA et al., 2003).

A cepa *Enterococcus faecium* CRL 183 tem sido muito estudada por nosso grupo de pesquisa, exibindo efeitos benéficos em estudos em animais e humanos (BEDANI et al., 2011; CAVALLINI et al., 2009; MIGUEL; ROSSI, 2003; ROSSI et al., 2003). Segundo Rossi et al. (2003), o consumo de um produto de soja fermentado por um inóculo misto de *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* 416, por um período de 6 semanas, foi capaz de manter inalterada a concentração de colesterol total e de LDL-colesterol, e de aumentar em 10% o nível do HDL-colesterol em homens normocolesterolêmicos. Outras propriedades benéficas relacionadas à cepa de *E. faecium* CRL 183 incluem: modulação do sistema imune; alteração benéfica da microbiota intestinal e redução do risco de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias intestinais e do desenvolvimento de câncer de cólon e de mama e osteoporose (BEDANI, 2008; CAVALLINI et al., 2011; CELIBERTO et al., 2015; KINOCHI, 2006; SIVIERI et al., 2008; SHIGUEMOTO et al., 2007).

Os microrganismos probióticos estão presentes principalmente em iogurtes, margarinas, leites fermentados, cereais, sobremesas à base de leite e queijos (SAAD, 2006; SAARELA, 2000; SANTOS, et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2002; RAUD, 2008). Observa-se, no entanto, uma diversificação do mercado de alimentos funcionais, com a produção de salames, sorvetes, gomas de mascar, néctar de frutas e chocolates com adição de probióticos

(ERKKILÄ et al., 2001; NEBESNY et al., 2007; PIMENTEL et al., 2011; POSSEMIERS et al., 2010). Esse mercado continua em franca expansão, sendo que atualmente, produtos probióticos representam cerca de 65% do mercado mundial de alimentos funcionais (BURGAIN et al., 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014).

A dificuldade encontrada para incorporação de probióticos em diferentes tipos de alimentos está relacionada à capacidade de sobrevivência das células, que depende de inúmeros fatores como: pH do alimento, temperatura de processamento e estocagem, disponibilidade de oxigênio, teor de água, presença de inibidores e competição com outros microrganismos (NEBESNY et al., 2007).

A seleção de matrizes e técnicas adequadas para incorporação dos microrganismos são fatores essenciais, que devem ser considerados no desenvolvimento de alimentos probióticos, pois a sobrevivência das cepas durante o trânsito gastrointestinal é afetada pelas propriedades físico-químicas e pelos fatores intrínsecos dos alimentos transportadores. Formulações de alimentos com intervalos de pH adequados e elevada capacidade de tamponamento eleva o pH do ambiente gástrico, melhorando assim, a estabilidade dos probióticos (RANADHEERA et al., 2010).

Os produtos lácteos, tradicionalmente utilizados para veicular microrganismos probióticos, enfrentam vários problemas que podem estar relacionados com a ingestão destes produtos, limitando a sua utilização em pessoas com intolerância à lactose e alergia a proteína do leite, além do uso necessário de refrigeração e uma vida de prateleira relativamente curta (LALICIC´-PETRONJEVIC´et al., 2015; RANADHEERA et al., 2010). Em adição, a crescente demanda por novos alimentos e sabores iniciaram uma tendência em desenvolver produtos probióticos não lácteos (RANADHEERA et al., 2010). Observa-se uma demanda crescente de bebidas e sobremesas probióticas com frutas (PEREIRA et al., 2011), legumes (YOON et al., 2006), leguminosas (HEENAN et al., 2004) e produtos derivados dos cereais (HELLAND et al., 2004; MRIDULA; SHARMA, 2015).

O desenvolvimento de produtos não-lácteos vem ganhando importância e merece atenção especial, pois deve garantir a manutenção da atividade e a viabilidade das células durante o armazenamento, uma vez que a maioria desses produtos é armazenada à temperatura ambiente (NEBESNY et al., 2007). Nesse sentido, a microencapsulação tem sido utilizada como uma forma de aumentar a resistência dos microrganismos probióticos e ampliar suas aplicações em diferentes tipos de alimentos (MAILLARD; LANDUYT, 2008).

2.5 Encapsulação de probióticos

A microencapsulação é definida como a tecnologia de envolver materiais sólidos, líquidos e gasosos em pequenas cápsulas que liberam seu conteúdo em velocidade controlada, sob condições específicas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). As cápsulas podem apresentar diversas formas e tamanhos, variando de frações de microns a milímetros (HUERTAS, 2010; MENEZES et al., 2012). A substância interna é denominada de material ativo enquanto que a externa é o agente encapsulante (MENEZES et al., 2012).

Esta tecnologia é muito utilizada na indústria alimentícia para melhorar o sabor, o aroma, o valor nutricional e a aparência dos produtos, bem como mascarar odores e sabores (inibindo a reação com outros materiais) (HUERTAS, 2010; VILLENA et al., 2009).

A microencapsulação de células bacterianas é uma técnica que permite proteger os materiais encapsulados de fatores como o calor e a umidade, mantendo assim a sua viabilidade e estabilidade durante a produção, armazenamento e manipulação (BURGAIN et al., 2011; PIATEK et al., 2012; VILLENA et al., 2009). A microencapsulação pode também ajudar a manter a viabilidade dos microrganismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrintestinal (SABIKHI et al., 2010). A técnica consiste em um processo de aprisionamento das células dos microrganismos por meio de um revestimento com hidrocolóides apropriados, com o objetivo de separar as células do meio circundante, liberando-as no meio intestinal (KRASAEKOOPT et al., 2003; MORTAZAVIAN et al., 2007; PICOT; LACROIX, 2003). Os agentes de liberação podem ser: mudanças de pH, tensões mecânicas, calor, atividades enzimáticas, pressão osmótica, presença de alguns componentes químicos e o tempo de armazenamento (GOUIN, 2004; MORTAZAVIAN et al., 2007).

A microencapsulação é essencial para a sobrevivência dos microrganismos probióticos, devido a sua sensibilidade às condições ambientais, tais como ar, umidade, temperatura, pH do estômago e soluções de sais biliares. No entanto, a adição de microcápsulas não deve afetar as propriedades sensoriais de produtos alimentares (BURGAIN et al., 2011; OZYURT; ÖTLES, 2014). As vantagens de se utilizar microrganismos encapsulados em produtos alimentares incluem: manutenção da viabilidade dos probióticos até o momento do consumo; melhora das propriedades sensoriais e melhora da imobilização das células probióticas para sua distribuição homogênea em todo o produto (MORTAZAVIAN et al., 2007).

Algumas características como a natureza e a estabilidade do material a ser encapsulado, características do polímero encapsulador, o processo de microencapsulação e as características do produto a ser obtido, devem ser consideradas no desenvolvimento de sistemas microencapsulados (OLIVEIRA, 2006).

Os materiais encapsulantes mais utilizados são: gomas (goma arábica, ágar, alginato e carragena); carboidratos (amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose); celulosas (carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose); lipídios (parafina, mono e diacilgliceróis); materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos) e proteínas (do glúten, caseína, gelatina e albumina) (JACKSON; LEE, 1991; SUAVE et al., 2006). De acordo com Jackson e Lee (1991), a escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores, entre eles a não reatividade com o material a ser encapsulado, o processo utilizado para a formação da microcápsula e o mecanismo de liberação ideal.

Há uma forte tendência de utilização de materiais de parede a base de polímeros naturais devido a vantagens como: facilidade de obtenção, baixa toxicidade, compatibilidade com outros ingredientes alimentares, maior biodisponibilidade, além de serem biodegradáveis (BOSNEA et al., 2014; CHEN et al., 1995; OZYURT; ÖTLES, 2014).

Diversas técnicas utilizadas para a microencapsulação são exploradas para proteger as bactérias probióticas sob condições adversas, permitindo sua liberação no intestino em um estado viável para exercer o seu efeito benéfico (BOSNEA et al., 2014; JACKSON; LEE, 1991). A seleção do método mais apropriado para a microencapsulação de células probióticas vai depender de inúmeros fatores como: tamanho das partículas desejadas, tipo das cápsulas, mecanismo de liberação, propriedades biológicas e físico-químicas do agente encapsulante e da cultura probiótica (BURGAIN et al., 2011; MENEZES et al., 2012). A forma e o tamanho das microcápsulas contendo probióticos é bastante variável, podendo variar de alguns micrômetros até vários milímetros, estando normalmente entre 0,2 e 500 μm (JACKSON; LEE, 1991).

Os métodos utilizados para microencapsulação de ingredientes/princípios ativos podem ser divididos em físico-químicos: coacervação simples ou complexa, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico, pulverização em agente formador de reticulação; físicos: *spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização; e químicos: polimerização interfacial, inclusão molecular (JACKSON; LEE, 1991).

Os processos mais utilizados para encapsular probióticos são: extrusão, *spray drying* ou atomização, *spray coating*, leite fluidizado, emulsão, imobilização em gordura e em grânulos de amido, gelificação iônica e coacervação (FAVARO-TRINDADE, 2011).

A maior parte dos estudos de microencapsulação aplicados em alimentos probióticos é realizada por dois métodos: a técnica de extrusão e a técnica de emulsão. A primeira técnica consiste na preparação de uma solução aquosa de uma mistura de célula- hidrocolóide e extrusão da suspensão, para que as gotículas resultantes escorram diretamente para a solução de endurecimento (HEIDEBACH et al., 2012). A extrusão possui a vantagem de não utilizar tratamento térmico, facilitando a aplicação em materiais termolábeis (HUERTAS, 2010; MENEZES et al., 2012).

Já a técnica de emulsão é um método que consiste na formação de uma mistura de célula- hidrocolóide em uma emulsão de óleo (tipo óleo/água ou óleo/óleo) (SUAVE et al., 2006). Nessa técnica o material encapsulante (alginato de sódio) é primeiramente misturado com a suspensão celular e esta mistura é então suspensa em óleo contendo Tween 80 como emulsificante. A emulsão formada é rompida com a adição de cloreto de cálcio (CaCl_2), formando as microcápsulas que, posteriormente, são coletadas por centrifugação (ROKKA; RANTAMAKI, 2010).

Outra técnica amplamente empregada é a de coacervação complexa. Esta técnica possui a vantagem de utilizar temperaturas brandas e de não utilizar solvente orgânico, podendo atribuir maior proteção aos microrganismos encapsulados (KRASAEKOOPT et al., 2003; SUAVE et al., 2006). Além disso, as microcápsulas produzidas por coacervação são insolúveis em água, possuindo excelentes características de liberação controlada e propriedades de resistência ao calor (MENDANHA et al., 2009).

Por outro lado, outras técnicas disponíveis podem ser prejudiciais aos microrganismos probióticos como *Spray drying*/atomização ou envolvimento lipossômico, pois requerem o emprego de altas temperaturas ou solventes orgânicos (LAMBERT et al., 2008).

O processo de secagem é uma etapa fundamental na produção de alimentos e de produtos farmacêuticos, já que o baixo conteúdo de água aumenta a vida de prateleira do produto (ALBADRAN et al., 2015). Um método de secagem que tem sido amplamente utilizado para probióticos microencapsulados é a liofilização (ALBADRAN et al., 2015; HEIDEBACH et al., 2010; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Na liofilização, a sublimação dos cristais de gelo sob pressão reduzida resulta na formação de microcápsulas secas e porosas, que podem ser facilmente manuseadas, transportadas e armazenadas durante um longo período de tempo, à temperatura ambiente (RATHORE et al., 2013; TRIPATHI;

GIRI, 2014). No entanto, a liofilização ainda tem algumas limitações que incluem, os altos custos operacionais devido às baixas temperaturas, elevado vácuo e longo tempo de secagem (OLIVEIRA et al., 2007; RATHORE et al., 2013).

2.5.1 Coacervação

A coacervação complexa envolve uma separação de duas fases e consiste na associação reversível de complexos de biopolímeros que interagem por ligações eletrostáticas, as quais vão depender das características físico-químicas do meio, como a temperatura, o grau de ionização e o pH (MENEZES et al., 2012; SUAVE et al., 2006; WEINBRECK et al., 2004). Estas interações entre biopolímeros são forças atrativas fracas e inespecíficas, dando origem à formação de complexos solúveis ou insolúveis. As interações repulsivas não-específicas entre biopolímeros são geralmente de natureza eletrostática e interações de Van der Waals e as interações atrativas não-específicas são interações fracas como as ligações iônicas, de hidrogênio ou hidrofóbicas (SCHMITT et al., 1998).

Os complexos formados levam à formação de duas fases líquidas distintas: uma fase superior, pobre em polímeros e rica em solvente, e uma fase inferior, concentrada em polímeros (coacervados complexos) (BOSNEA et al., 2014; GOUIN, 2004; SCHMITT et al., 1998).

Existem dois métodos de coacervação, a simples e a complexa, dependendo se o sistema contém um ou mais biopolímeros (SCHMITT et al., 1998). A coacervação simples consiste na evaporação do solvente que envolve as moléculas do colóide, através da adição de outro solvente não eletrólito (sais ou álcoois), no qual o hidrocolóide é insolúvel (KESTER et al., 1986).

Tiebackx foi o pioneiro no estudo do método de coacervação, entretanto, Bungenberg de Jong e Kruyt em 1929 foram os primeiros a investigar, de forma extensiva, o sistema de goma arábica-gelatina (KRUIF et al., 2004; SUAVE et al., 2006). Atualmente, a tendência da microencapsulação é substituir este sistema tradicional de goma arábica-gelatina por novos biopolímeros, para obter novas propriedades nas cápsulas (KRUIF et al., 2004).

A coacervação embora menos explorada é uma tecnologia muito promissora devido à sua elevada capacidade de carga e de liberação efetiva dos encapsulantes por esforço mecânico, pela temperatura e também por mudanças de pH (BOSNEA et al., 2014; GOUIN, 2004). É um processo reversível e a formação de microcápsulas é um processo de equilíbrio. Caso este equilíbrio seja deslocado, a separação de fase não ocorre. Para que este equilíbrio

ocorra, os polímeros devem possuir propriedades coloidais, densidades de cargas adequadas e cadeias lineares, como as gelatinas, gomas, alginatos, caseínas e pectinas (BOSNEA et al., 2014).

Entre os vários polímeros naturais, a utilização de matrizes com proteínas e polissacarídeos tem aumentado recentemente em vários segmentos industriais, como em produtos farmacêuticos, químicos, cosméticos, alimentares e em probióticos, devido principalmente, a baixa toxicidade e maior biodisponibilidade (ALVIM; GROSSO, 2010).

A pectina se destaca por ser uma matéria-prima abundante, barata e renovável. (MENDANHA et al., 2009). É um polissacarídeo natural, solúvel em água, encontrado na parede celular primária e nas camadas intercelulares de plantas terrestres, extraído do material péctico de algumas frutas, e encontrado em maior quantidade em frutas cítricas e maçãs, e também em sementes de girassol e de beterraba (BRANDAO; ANDRADE, 1999; MENDANHA et al., 2009). As pectinas são tradicionalmente classificadas de acordo com o seu grau de metilação em: baixo teor de esterificação (25 a 50% dos grupos carboxílicos esterificados) e alto teor de esterificação (50 a 80% dos grupos carboxílicos esterificados) (BRANDAO; ANDRADE, 1999).

Pectina de alto teor de esterificação geleifica por meio da formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, na presença de ácidos e açúcares. Já as pectinas de baixo teor de esterificação, o gel é formado na presença de cátions divalentes (cálcio) que agem como uma ponte entre grupos carboxílicos. A interação entre os grupos carboxílicos das moléculas de pectina e os íons cálcio formam estruturas conhecidas como "caixa de ovos" (FANG et al., 2008). Quimicamente as moléculas de pectina são compostas por uma cadeia linear de unidades repetidas do ácido D-galacturônico em ligação do tipo α (1 \rightarrow 4), e parte destas unidades apresenta-se esterificada, como éster metílico (BRANDAO; ANDRADE, 1999; FANG et al., 2008).

A utilização de proteínas na microencapsulação de microrganismos probióticos tem sido explorada devido a sua compatibilidade com a maioria das matrizes alimentícias, sua capacidade de formar microcápsulas por diferentes técnicas e sua digestibilidade, importantes para liberação dos probióticos no trato gastrointestinal (HEIDEBACH et al., 2012). As principais proteínas do leite são as proteínas do soro de leite (α -lactoglobulina, β -lactoglobulina, albumina e imunoglobulina), as proteínas da membrana dos glóbulos de gordura do leite e a caseína (α , β , e κ -caseína) (KENT; DOHERTY, 2014; ZHOU et al., 2015). As diferentes frações de caseína correspondem a 80% da proteína do leite e são

bastante utilizadas em alimentos funcionais e aplicadas na microencapsulação de probióticos (ZHOU et al., 2015)

As interações com polissacarídeos podem influenciar as propriedades funcionais das proteínas, tais como a solubilidade, a estabilidade conformacional, a capacidade de formar gel e as propriedades emulsificantes (YE, 2008). No entanto, pode haver uma interação atrativa entre elas durante o processo de produção, pois a formação de complexos entre proteínas do leite e polissacarídeos ocorrem principalmente por interações eletrostáticas, as quais são influenciadas pelo pH, força iônica, carga e concentração do polissacarídeo e a proporção dos biopolímeros (SCHMITT et al., 1998; YE, 2008).

Estudos prévios realizados por Baracat et al. (2004) e Oliveira (2006) demonstraram uma formação adequada de um complexo de pectina e caseína bovina em meio aquoso e em condições brandas de pH (8,0 a 5,0) e temperatura de 25°C.

2.6 Chocolate como veículo para microrganismos probióticos

Uma forma de oferecer um produto inovador e nutritivo, satisfazendo as necessidades dos consumidores, seria agregar valor funcional ao chocolate, através da adição de microrganismos probióticos e/ou substâncias prebióticas (MOREIRA et al., 2010).

Um novo produto probiótico representa um desafio tecnológico, pois a viabilidade das cepas deve se manter elevada durante o processamento e período de estocagem, bem como durante o seu consumo, resistindo às condições adversas do trato gastrintestinal (SAARELA et al., 2004). Teoricamente, é possível conseguir um número alto de células viáveis através da introdução de quantidades maiores de probióticos durante a produção, porém algumas limitações podem ocorrer e comprometer as propriedades sensoriais do produto e seu custo-benefício (LALICIC´-PETRONJEVIC´et al., 2015).

Por ser um alimento utilizado em várias preparações (bolos, biscoitos, pães, etc.), com boa aceitação por parte dos consumidores, principalmente por crianças, o chocolate pode ser considerado um veículo ideal para microrganismos probióticos (NEBESNY et al., 2007; SILVA et al., 2006). Além disso, o chocolate possui características que favorecem a incorporação e podem proteger diferentes cepas probióticas, como pH mais elevado, boa capacidade de tamponamento, consistência mais sólida e maior teor de gordura (MANDAL et al., 2012). A associação da técnica de microencapsulação também pode auxiliar na obtenção

de um chocolate probiótico mais estável e resistente às condições adversas de processamento, estocagem e passagem pelo sistema digestivo (MANDAL et al, 2012).

Alguns estudos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver chocolates com adição de probióticos microencapsulados ou não. Coman et al. (2012) desenvolveram vários alimentos não-lácteos, com destaque para dois tipos de barras de chocolate (chocolate amargo e chocolate ao leite) com adição da mistura de probióticos (1:1) *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® e *Lactobacillus paracasei* IMC 502® (SYNBIO®). A viabilidade das bactérias probióticas manteve-se na ordem de 10^7 - 10^9 UFC/g durante a vida de prateleira dos produtos, por um período de 12 meses à temperatura ambiente e houve um aumento significativo da vida útil dos dois tipos de barras de chocolate ($p < 0,05$). Mandal et al. (2012) desenvolveram um chocolate ao leite simbiótico, com adição de inulina e de *Lactobacillus casei* NCDC 298 livre e encapsulado. A população de *Lactobacillus* spp. se manteve acima de 10^8 UFC/g por um período de 60 dias sob refrigeração. O consumo do produto contendo microrganismos encapsulados resultou em aumento na população de lactobacilos fecais e diminuição de coliformes termotolerantes e da atividade da enzima β -glucuronidase em ratos. Em outro estudo, pesquisadores avaliaram a viabilidade do uso de chocolate como veículo de uma cultura mista constituída de *Lactobacillus helveticus* CNCM I-1722 e *Bifidobacterium longum* CNCM I-3470 microencapsulados. Os resultados mostraram que a viabilidade das duas cepas no produto foi superior a 10^8 UFC/g e que o chocolate (amargo e ao leite) melhorou a resistência gastrointestinal dos microrganismos probióticos (POSSEMIERS et al., 2010).

Lalicic'-Petronijevic'et al., (2015), investigaram a viabilidade de cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* NCFM® e *Bifidobacterium lactis* HN019 incorporadas em chocolates do tipo amargo e ao leite, mantidos a 4°C e 20°C, durante o período de armazenamento de 180 dias. A cepa probiótica *L. acidophilus* NCFM® apresentou população de células viáveis superior a da cepa *B. lactis* HN019 em ambos os tipos de chocolates e a temperatura de 4°C favoreceu a manutenção da viabilidade.

3 CONCLUSÃO

O chocolate apresenta características físico-químicas adequadas, propriedades de saúde comprovadas e um ótimo desempenho de mercado, com forte apelo junto à população. Considerando a necessidade de diversificação do mercado de alimentos funcionais, o

chocolate, em suas diferentes formas, destaca-se como um potencial veículo para microrganismos probióticos. A produção de chocolates com adição de microrganismos probióticos microencapsulados pode aumentar a resistência das cepas e potencializar os seus potenciais efeitos benéficos à saúde.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB (Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados). Disponível em < <http://www.abicab.org.br/>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

AFOAKWA, E. O. et al. Fat bloom development and structure-appearance relationships during storage of under-tempered dark chocolates. **Journal of Food Engineering**, v.91, n.4, p. 571-581, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005, Aprova Regulamento Técnico para Chocolate e Produtos de Cacau. *Diário Oficial da União*, 23 set., 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 18. Aprova o "Regulamento técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos ". *Diário Oficial da União*, 24 de març. 2008a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, jul., 2008b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 12 fev. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. *Diário Oficial da União*, 13 nov., 2012.

ALBADRAN, H.A. et al. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. **Food Research International**, v. 74 p.208–216, 2015.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.4, p.1069-1076, 2010.

AHMADOVA, A. et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v.30, n.2, p.631-641, 2013.

AZUCAR. Produccion y consumo de azucar y otros endulzantes. **Ducelandia**, p. 33-34, junho, 1999.

BARACAT, M. M. et al. Microcapsule processing in a spotted bed. **Canadian Journal Chemistry Engenieer**, v. 82, p. 1-8, 2004.

BARBOSA, J. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v.191, p.144–148, 2014.

BECKETT, S. T. Traditional chocolate making. In: BECKETT, S. T. (Org). **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. London: Black Academic e Professional, p.1-7, 1994.

BEDANI, R. **Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

BEDANI, R. et al. Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fedon a beef-based animal diet. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.3, p. 1238-1247, Jul./set., 2011.

BOSNEA, A. L. et al. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. **Food Bioprocess Technology**, v.7, n. 10, p. 2767-2781, 2014.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, p. 38-44, 1999.

BUIJSSE, B. et al. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen elderly study. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 4, p. 411-417, 2006.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011.

CAVALLINI, D. C. U. et al. Effect of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol- fed rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.1, p.1, 2009.

CAVALLINI, D. C. U. et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 126, 2011.

CELIBERTO, L.S.; BEDANI, R.; ROSSI, E.A. CAVALLINI, D.C.U. Probiotics: The Scientific Evidence in the Context of Inflammatory Bowel Disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015. No prelo.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, n.2, p. 184-190, 2007.

CHEN, J. et al. Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 69-76, 1995.

CHETANA, R. et al. Preparation and Properties of Probiotic Chocolates Using Yoghurt Powder. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n.3, p. 276-281, 2013.

COHEN, K. O. et al. Revisão: Temperagem ou Pré-Cristalização do Chocolate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n.1, p.23-30, 2004.

COMAN, M. M. et al. Functional foods as carriers for Synbio®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n.3, p. 346-352, 2012.

CUNHA, T. M. et al. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

DILLINGER, T. L. et al. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2057S-2072S, 2000.

ELLAM, S.; WILLIAMSON, G. Cocoa and Human Health. **Annual Review of Nutrition**, v.33, p. 105-128, 2013.

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. **Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 187-193, 2014.

ERKKILÄ, S. et al. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat. **Meat Science**, v. 58, n.2, p. 111-116, jun., 2001.

FANG, Y. et al., 2008. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 334-341, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulação de probióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 1ed. São Paulo: Varela, 2011, v.1, p. 239-254.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Codex Alimentarius Commission. Recommended international standard for chocolate. Roma, FAO/WHO, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001, 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2013[Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FUHRMAN, E. Bountiful benefits. Candy Industry, v. 169, n. 11, p. 46-47, 2004. Disponível em: <<http://www.candyindustry.com/>>. Acesso em: 12 de fev. 2015.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FRANCIS, S. T. et al. The effect of flavanol-rich cocoa on the fMRI response to a cognitive task in healthy young people. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. 221-223, 2006.

GARDINER, E. G. et al. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.47, n. 2, p. 4907-4916, 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 7, p. 330-347, 2004.

GOMES, C. R. et al. Influência de diferentes agentes de corpo nas características reológicas e sensoriais de chocolates *diet* em sacarose e *light* em calorias. **Revista Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 614-623, 2007.

GRASSI, D. et al. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 3, p. 611-614, 2005a.

GRASSI, D. et al. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 398-405, 2005b.

HEENAN, C. N. et al. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.37, n.4, p.461-466, 2004.

HEIDEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 309-316, 2010.

HEIDEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 291-311, 2012.

HELLAND, M. H. et al. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. **International Dairy Journal**, v.14, n. 11, p.957-965, 2004.

HERMANN, F. et al. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. **Heart**, v. 92, n. 1, p. 119-120, 2006.

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**, v. 11, p.506–514, 2014.

HUERTAS, R. A. P. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín**, v. 63, n.2, p. 5669-5684, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo, 2010. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br> >. Acesso em: 22 jun. 2013.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT – Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JUARISTI, G. M. et al. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 2, p. 289-292, 2011.

KATZ, D. L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 15, n. 10, 2011.

KENT, R.M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, v. 64, p. 567-576, 2014.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v.10, n.12, p.4759, 1986.

KINOUCI, F.L. “Iogurte” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. 2006. 85f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KONAR, N. et al. Using polydextrose as a prebiotic substance in milk chocolate: effects of process parameters on physical and rheological properties. **CyTA – Journal of Food**, v. 12, n.2, p.150-159, 2014.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003.

KRUIF et al., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.9, n. 5, p.340–349, 2004.

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**, v.15, p. 541-550, 2015.

LAMBERT, J. M.; WEINBRECK, F.; KLEEREBEZEM, M. *In vitro* analysis of protection of the enzyme bile salt hydrolase against enteric conditions by whey protein –gum arabic microencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8360-8364, 2008.

LARENAS, C. J. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19, p. 111-115, 2002.

- LARSSON, S. C. et al. Chocolate consumption and risk of stroke: A prospective cohort of men and meta-analysis. **Neurology**, v. 79, n. 12, p. 1223-1229, 2012.
- LATIF, R. Chocolate/cocoa and human health: a review. **The Journal of Medicine**, v. 71, n. 2, p. 63-68, 2013.
- LOISEL, C. et al. Fat Bloom and Chocolate Structure Studied by Mercury Porosimetry. **Journal of Food Science**; v.62, n.4, p.781-788, 1997.
- MAILLARD, M.; LANDUYT, A. Chocolate: an ideal carrier for probiotics. **Agro Food Industry hi-tech**, v. 19, n. 3, p. 13-15, 2008.
- MANDAL, S. et al. Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 5, p. 1031-1037, 2012
- MARTIN, F. P. J. et al. Metabolic effects of dark chocolate consumption on energy, gut microbiota, and stress-related metabolism in free-living subjects. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 12, p. 5568-5579, 2009.
- MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.
- MATSUI, N. et al. Ingested cocoa can prevent high fat diet induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. **Nutrition**, v. 21, n. 5, p. 594-601, 2005.
- MENDANHA, D. V. et al. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1099-1104, 2009.
- MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2012.
- MIGUEL, D. P.; ROSSI, E. A. Viabilidade de bactérias ácido lácticas em sorvetes de iogurte durante o período de estocagem. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 93 – 96, 2003.
- MINIFIE, B. W. Chocolate, cocoa, and confectionery: science and technology. 3ed. AVI Book published by Van Nostrand Reinhold, 940p. New York, 1985.
- MOREIRA, R. W. M. et al. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, n. 4, p. 435-438, 2010.
- MORTAZAVIAN, A. M. et al. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2007.
- MRIDULA, D.; SHARMA, M. Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 482-487, 2015.

NEBESNY, E. et al. Properties of sucrose-free chocolates enriched with viable lactic acid bacteria. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3-4, p.358-362, 2005.

NEBESNY, E. et al. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 1, p. 33-42, 2007.

NEBESNY, E.; ŻYŻELEWICZ, D. Effect of lecithin concentration on properties of sucrose-free chocolate masses sweetened with isomalt. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 2, p. 131-135, 2005.

NURK, E. et al. Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. **Journal Nutrition**, v.139, n. 1, p. 120-127, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diabetes Programme. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/en/>>. Acesso em: 14 jun. 2013.

OLINGER, P. M. Lactitol: its use in chocolate, xylitol as a sanding medium. **The Manufacturing Confectioner**, v. 75, p 92-95, 1995.

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida por secagem por *spray drying* e leite de jorro**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 77 p., 2006.

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**, v. 25, n.10, p.1687-1693, 2007.

OZYURT, V. H.; ÖTLES, S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 4, p. 413-424, 2014.

PARPINELLO, G. P. et al. Stevioside as a replacement of sucrose in peach juice: sensory evaluation. **Journal of Sensory Studies**, v. 16, n. 5, p. 471-484, 2001.

PEARSON, D. A. et al. The effects of flavanol rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. **Thrombosis Research**, v. 106, n. 4, p. 191-197, 2002.

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

PIATEK, J. et al. The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination in vitro study. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 19, n.1, p.92-102, 2012.

- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 505-515, 2004.
- PIMENTEL, T. C.; PRUDENCIO, S. H.; RODRIGUES, R. S. Néctar de pêssego potencialmente simbiótico. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 3, p.455-464, 2011.
- POSSEMIERS, S. et al. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 97-103, 2010.
- RANADHEERA, R. D. C. S et al. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013.
- RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da danone e da nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista Sociologia e Política**, Curitiba, v. 16, n. 31, p. 85-100, 2008.
- REIN, D. et al. Cocoa inhibits platelet activation and function. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 30-35, 2000.
- RIBOLDI, G. P. et al. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 2009.
- RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, 2007.
- ROKKA, S.; RANTAMAKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 1, p.-1-12, 2010.
- ROSSI, E. A. et al. Intake of isoflavone- supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of hypercholesterolemic rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 275-282, 2008.
- ROSSI, E. A. et al. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v. 53, n. 1, p. 47-51, 2003.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SAARELA, M. et al. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 6, p. 1205-1214, 2004.

SAAVEDRA, L. et al. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 241-245, 2003.

SABIKHI, L.; BABU, B.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 586-593, 2010.

SANTOS, R. B. et al. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v.1, n. 2, 2011.

SILVA, E. G. P et al. Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 2, p. 159-162, 2006.

SIVIERI, K. et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male wistar rats. **European Food Research Technology**, v. 228, n. 2, p. 231-237, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

SUAVE, et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SUBRAMANIAN, P.; MURPHY, O. Contraction of milk chocolate. **The Manufacturing Confectioner**, v. 81, n.6, p. 61-66, 2001.

SCHRAMM D. D. et al. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, n.1, p.36-40, 2001.

SCHMITT, C. et al. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n.8, p. 689-753, 1998.

SCHMITZ, H. H. et al. Chocolate, flavonoids and heart health. **The Manufacturing Confectioner**, v.81, n.9, p.95-99, 2001.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Isoflavone-supplemented fermented soy product associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. **Mauritas**, v. 57, n. 3, p. 261-270, 2007.

TAUBERT, D. et al. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. **JAMA**, v. 290, n. 8, p.1029-30, 2003.

- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional foods**, v.9, p. 225-241, 2014.
- VALENZUELA, B. A. El chocolate, un placer saludable. **Revista Chilena Nutrición**, v. 34, n. 3, p. 180-190, 2007.
- VERNA, R. The history and science of chocolate. **Malaysian Journal of Pathology**, v. 35, n. 2, p. 111-121, 2013.
- VILLENA, M. M. J. et al. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. **ARS Pharmaceutica**, v.50, n.1, p 43-50, 2009.
- VISIOLI, F. et al. Chocolate, lifestyle, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 299-312, 2009.
- WALTERS, M. R. et al. Acute effects of chocolate ingestion on cerebral vasculature. Disponível em: <http://www.neurology.org/content/by/year>. Acesso em: 14 jun. 2013.
- WEINBRECK, F. et al. Complexation of whey proteins with carrageenan. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3550-3555, 2004.
- WISWEDEL, I. et al. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F₂-isoprostane concentrations in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 411-21, 2004.
- YANO, J.; SATO, K. FR-IR. Studies on polymorphism of fats: molecular structures and interactions. **Food Research International**, v. 32, n. 4, p. 249-259, 1999.
- YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 406-415, 2008.
- YOON, K. Y. et al. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 12, p.1427-1430, 2006.
- ZOMER, E. et al. The effectiveness and cost effectiveness of dark chocolate consumption as prevention therapy in people at high risk of cardiovascular disease:best case scenario analysis using a Markov model. **BMJ**. v. 344, p. e3657, 2012.
- ZHOU, S. et al. Interactions of caseins with phenolic acids found in chocolate. **Food Research International**, v. 74, p. 177-184, 2015.

CAPÍTULO II

**DESENVOLVIMENTO DE UM CHOCOLATE *DIET* EM BARRA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DE
Enterococcus faecium CRL183**

RESUMO

A preocupação e interesse dos consumidores com relação à manutenção da saúde e o envelhecimento saudável, combinado à popularidade do chocolate no mundo e a seus benefícios à saúde, foram fatores que impulsionaram a realização desse trabalho. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento e a caracterização de um chocolate *diet* em barra, potencialmente probiótico, com adição da cepa *Enterococcus faecium* CRL 183, nas formas livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada. A cepa probiótica foi microencapsulada pela técnica de coacervação complexa, utilizando-se pectina e caseína bovina como materiais de parede. Os chocolates foram produzidos em três tratamentos: I – chocolate sem adição da cepa probiótica; II – chocolate com adição da cepa probiótica liofilizada; III – chocolate com adição da cepa probiótica microencapsulada e liofilizada. Para determinar a eficiência do processo de microencapsulação, a viabilidade da cepa probiótica, microencapsulada ou não, foi acompanhada por um período de 270 dias. Os chocolates prontos para o consumo foram mantidos à temperatura de 25°C e a viabilidade do microrganismo probiótico foi acompanhada durante 180 dias. A qualidade dos produtos foi monitorada durante o processamento e armazenamento através de análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, incluindo a determinação da resistência gastrintestinal *in vitro*. Os resultados obtidos indicaram que o método de microencapsulação seguido de liofilização melhorou a viabilidade da cepa probiótica durante o período de armazenamento à temperatura ambiente, sendo observada uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 69,2% e 89,6% para as formas livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada, respectivamente. O chocolate com adição do microrganismo na forma livre liofilizada (II) e microencapsulada e liofilizada (III) se manteve estável durante o período de estocagem, não sendo observada alteração logarítmica em relação à população inicial de microrganismos probióticos. Os testes de resistência gastrintestinal evidenciaram que o processo de microencapsulação seguido de liofilização melhora a resistência da cepa *E. faecium* na fase gástrica. Todos os tratamentos apresentaram boa aceitação sensorial, exibindo médias superiores a 7,0 (gostei moderadamente) para os atributos avaliados, verificando-se uma tendência de menores médias para o tratamento III, em relação ao atributo textura. Os chocolates probióticos obtidos apresentaram bom potencial para serem introduzidos no mercado, com aceitação e intenção de compra positiva e boa estabilidade durante o período de armazenamento à temperatura ambiente. A cepa na forma microencapsulada e liofilizada mostrou-se a mais indicada para manter a viabilidade do probiótico no chocolate durante a passagem pelo ambiente gastrintestinal.

Palavras-chave: Chocolate. Alimento funcional. Probiótico. Coacervação complexa. Microencapsulação.

DEVELOPMENT OF A POTENTIALLY PROBIOTIC *DIET* CHOCOLATE IN BAR WITH ADDITION *Enterococcus faecium* CRL 183

ABSTRACT

The concerns and interests of consumers with respect to health maintenance and healthy aging, combined with the popularity of chocolate in the world and its health benefits, were the factors that motivated the development of this study. The aim of this study was the development and characterization of a diet chocolate bar, potentially probiotic, with the addition of *Enterococcus faecium* CRL strain 183 in the free and microencapsulated lyophilized and lyophilized forms. The probiotic strain was microencapsulated by complex coacervation technique, using pectin and bovine casein as wall materials. The chocolates were produced in three trials: I - chocolate without adding probiotic strain; II - chocolate with addition of freeze-dried probiotic strain; III - chocolate with addition of microencapsulated and lyophilized probiotic strain. In order to determine the efficiency of the microencapsulation process, the viability of the probiotic strain, microencapsulated or not, was observed during a period of 270 days. The chocolates ready for consumption were maintained at 25°C and the viability of the probiotic microorganism was monitored during 180 days. The products quality was monitored during processing and storage through microbiological, physical-chemical and sensory analysis, including the determination of *in vitro* gastrointestinal resistance. The results indicate that the microencapsulation method followed by lyophilization have improved the viability of the probiotic during the storage period at room temperature, considering a observed survival rate of approximately 69.2% and 89.6% for free lyophilized forms and microencapsulated and lyophilized, respectively. The chocolate with addition of lyophilized microorganism in free form (II) and microencapsulated and lyophilized form (III) remained stable during the storage period, considering no logarithmic changes observed in relation to the initial population of probiotic microorganisms. Gastrointestinal resistance tests revealed that the microencapsulation process followed by lyophilization improves the strain resistance in *E. faecium* gastric phase. All treatments showed good sensory acceptability, exhibiting averages above 7.0 (liked moderately) for the evaluated attributes, verifying a lower average trend for trial III in relation to the texture attribute. The obtained probiotic chocolates showed good potential to be marketed with positive acceptance and intention of purchasing, as well as good stability during the storage period at room temperature. The strain in microencapsulated and lyophilized form proved to be the most suitable to maintain the viability of the probiotic in chocolate during passage through the gastrointestinal environment.

Keywords: Chocolate. Functional food. Probiotic. Complex coacervation. Microencapsulation.

1 INTRODUÇÃO

O interesse dos consumidores por uma alimentação equilibrada tem incentivado o desenvolvimento de produtos saudáveis, que possuam propriedades funcionais e que contribuam para o bem estar dos indivíduos (GOMES et al., 2007).

Nessa categoria o chocolate surge como uma excelente alternativa de matriz para a incorporação de microrganismos probióticos, uma vez que é um produto reconhecido por suas propriedades sensoriais, pelos seus benefícios nutricionais (NORHAYATI et al., 2013) e muito apreciado por crianças, jovens, adultos e idosos, além de ser utilizado em várias preparações (bolos, biscoitos, pães, etc.) (NEBESNY et al., 2007; SILVA et al., 2006). Adicionalmente, quando formulado com ausência de sacarose, o chocolate tende a ser mais atraente, especialmente para indivíduos portadores de diabetes, hipoglicêmicos, obesos e aqueles que almejam uma alimentação saudável (GOMES et al., 2007).

Comparado a outros produtos probióticos, como leite fermentado e iogurtes, o chocolate possui características que favorecem a incorporação de diferentes cepas probióticas, durante a produção e armazenamento. Esta vantagem pode ser atribuída ao seu pH mais elevado, baixa atividade de água, boa capacidade de tamponamento, consistência mais sólida e maior teor de gordura, facilitando a manutenção da viabilidade do microrganismo durante as etapas de produção e estocagem (MANDAL et al., 2012).

Considerando que os efeitos dos probióticos são cepa-dependentes, como já documentado em diferentes estudos (LALICIC´-PETRONIJEVIC´ et al., 2015), 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 (KOMATSU et al., 2008).

Enterococcus spp. é um gênero de bactérias Gram-positivas, composto por 16 espécies que se multiplicam e sobrevivem em condições adversas do meio. Cepas específicas de *Enterococcus* spp., principalmente às pertencentes a espécie *Enterococcus faecium*, são consideradas probióticas por melhorar o equilíbrio microbiano do trato gastrintestinal e exercerem outros efeitos benéficos (LARENAS, 2002; RIBOLDI et al., 2009). Estudos anteriores realizados por nosso 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 (BEDANI et al., 2011; CAVALLINI et al., 2009; CAVALLINI 2011; MIGUEL; ROSSI, 2003; ROSSI et. al., 2003). Os resultados obtidos indicam que a cepa de *E. faecium* CRL 183 apresenta capacidade de modulação do perfil lipídico e da microbiota intestinal (BEDANI, 2008; CAVALLINI et al, 2011), redução do risco de desenvolvimento de câncer

de cólon (SIVIERI et al., 2008) e mama (KINOUCI et al., 2012), e melhora nos sintomas de doenças inflamatórias intestinais (CELIBERTO et al., 2015). Na grande maioria dos estudos citados anteriormente, o microrganismo probiótico foi utilizado como cultura iniciadora em produtos à base de soja, indicando a necessidade de estudos visando a possibilidade de aplicação da mesma cepa em diferentes alimentos.

Os produtos lácteos, tradicionalmente utilizados para veicular microrganismos probióticos, possuem algumas desvantagens como o fato de não poderem ser consumidos por pessoas com intolerância à lactose e alergia à proteína do leite, a necessidade de armazenamento sob refrigeração e o fato de possuírem uma vida de prateleira relativamente curta (LALICIC´-PETRONIJEVIC´et al., 2015; RANADHEERA et al., 2010). Ademais, a crescente demanda por novos alimentos e sabores iniciaram uma tendência em desenvolver produtos probióticos não lácteos (RANADHEERA et al., 2010). Vários trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver chocolates com adição de probióticos (COMAN et al., 2012; CHETANA et al., 2013; FOONG et al., 2013; LALICIC´-PETRONIJEVIC´et al., 2015; MAILLARD; LANDUYT, 2008; MANDAL et al., 2012; NEBESNY et al., 2005; NEBESNY et al., 2007; NORHAYATI et al., 2013; NORHAYATI; MOHD, 2014; POSSEMIERS et al., 2010; ZYŻELEWICZ et al., 2010), no entanto, poucos são os estudos que desenvolvem chocolates *diet* probióticos.

O desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos merece atenção especial, pois deve garantir a manutenção da atividade e viabilidade das células durante o processamento e armazenamento, uma vez que a maioria desses produtos é armazenada à temperatura ambiente (NEBESNY et al., 2007).

A técnica de microencapsulação tem sido utilizada como estratégia para a obtenção de maiores taxas de sobrevivência de cepas probióticas durante as diferentes etapas de produção e armazenamento e ampliação das suas aplicações em diferentes tipos de alimentos (MAILLARD; LANDUYT, 2008), além de auxiliar na manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (MARTÍN et al., 2015; SABIKHI et al., 2010).

A microencapsulação é definida como a tecnologia de envolver materiais sólidos, líquidos e gasosos em pequenas cápsulas que liberam seu conteúdo em velocidade controlada, sob condições específicas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). Diversas técnicas utilizadas para a microencapsulação são exploradas para proteger as bactérias probióticas sob condições adversas, permitindo sua liberação no intestino em um estado viável para exercer o seu efeito benéfico, e a escolha do método depende da aplicação que será dada à microcápsula, tamanho,

mecanismo de liberação e propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (BOSNEA et al., 2014; JACKSON; LEE, 1991). A coacervação complexa é uma tecnologia muito promissora devido à sua elevada capacidade de carga e de liberação efetiva dos encapsulantes por esforço mecânico, pela temperatura e também por mudanças de pH (BOSNEA et al., 2014; GOUIN, 2004), além de possuir a vantagem de ser realizada em temperaturas brandas e de não utilizar solvente orgânico, podendo garantir maior proteção aos microrganismos encapsulados (KRASAEKOOPT et al., 2003; SUAVE et al., 2006).

Diante das considerações acima, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e a caracterização de um chocolate em barra, isento de sacarose, com adição da cepa probiótica *E. faecium* CRL183 nas formas livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada, utilizando a coacervação complexa como técnica de microencapsulação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Chocolate *diet* com adição da cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 (Centro de Referência para Lactobacilos-CERELA, Argentina), nas formas liofilizada e microencapsulada e liofilizada.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação e avaliação da cultura probiótica

Reativação e propagação da cultura probiótica

A cepa pura de *E. faecium* CRL 183 foi mantida congelada (-80°C) em um meio composto por leite em pó desnatado reconstituído (10% p/v), suplementado com 1,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 1,0% de glicerol. Os inóculos foram preparados pela transferência de 10% da cultura de manutenção de *E. faecium* CRL 183 ativada, para meio MRS (Man Rogosa Sharpe - Himedia, Índia), seguido de incubação a 37°C por 14-16 horas.

Microencapsulação da cultura probiótica

A microencapsulação da cepa probiótica de *E. faecium* CRL 183 foi realizada pela técnica de coacervação complexa, segundo metodologia descrita por Baracat et al. (2004) e Oliveira (2006), com modificações. Inicialmente preparou-se uma solução contendo polímeros de pectina cítrica (Vetec Química Fina Ltda., Brasil) e caseína bovina (Sigma Aldrich, EUA) (concentração de sólidos totais 8%) como materiais de parede, que foram dispersos em água destilada sob agitação mecânica constante. Ajustou-se o pH para 8,0 usando uma solução de hidróxido de sódio P.A 4,0M (Synth, Brasil). A seguir, a mistura foi esterilizada em autoclave (Phoenix modelo AV 75, Brasil) a 121°C por 15 minutos. Após completa dispersão dos polímeros, a cepa *E. faecium* CRL 183 em caldo MRS (10^8 UFC/ml - unidades formadoras de colônias por mililitro) foi adicionada à mistura em condições assépticas e monitorou-se a redução do pH para 5,3.

As microcápsulas obtidas foram congeladas a -80°C (Freezer INDREL - Modelo IULT 335D) e, em seguida, foram desidratadas pelo processo de liofilização (Liofilizador Labconco Freezone®), por aproximadamente 24 horas. Após a secagem, as microcápsulas foram armazenadas em frascos estéreis, à temperatura ambiente, para posterior avaliação da eficiência do processo.

Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade do microrganismo probiótico nas formas livre liofilizada, microencapsulada e microencapsulada e liofilizada foi realizada imediatamente após os processos de microencapsulação e liofilização e durante 270 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Para a determinação da viabilidade celular foi utilizado o meio de cultura M17 (Himedia, Índia), específico para o gênero *Enterococcus* spp., e a incubação realizada em aerobiose, a 37°C/48 horas. As colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/g (ROSSI et al., 2008).

Caracterização morfológica das microcápsulas com cultura probiótica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação da morfologia das microcápsulas foi feita através de microscópio eletrônico de varredura convencional (MEV; Topcon, modelo SM300), com voltagem de 10kV. As amostras das microcápsulas liofilizadas foram distribuídas sobre uma fita adesiva metálica (dupla-face) e os pós foram fixados em uma das faces da fita, a outra face foi colocada em *stubs*, e em seguida foi realizado o recobrimento com uma fina camada de ouro por 50 segundos, aplicando uma corrente de 40 mA.

2.2.2 Elaboração do chocolate probiótico

Matérias-primas e ingredientes

Para a produção do chocolate foram utilizados: polidextrose (Tate & Lyle, Brasil) e maltitol (Labonathus, Brasil) como agentes de corpo; manteiga de cacau e líquido de cacau (Barry Callebaut, Brasil); lecitina de soja (Solae, Brasil); Poliglicerol Polirricinoleato Grinsted (PGPR 90 - Danisco, Dinamarca); leite em pó desnatado e integral (Tangará Foods, Brasil); sucralose (Tate & Lyle, Brasil) e aroma de baunilha (Fleischmann, Brasil). Todas as matérias-primas e ingredientes foram cedidos por representantes ou fabricantes nacionais.

A etapa de processamento do chocolate foi realizada na planta piloto do Chocotec, no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Brasil). O procedimento para obtenção dos chocolates foi baseado nas recomendações de Gomes et al. (2007), com modificações, sendo preparados três diferentes tratamentos: I - (controle - sem adição da cultura probiótica); II - (com adição da cultura probiótica na forma livre liofilizada) e III - (com adição da cultura probiótica microencapsulada pela técnica de coacervação complexa seguida de liofilização).

Os ingredientes utilizados na elaboração do chocolate e suas respectivas concentrações são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Formulação básica para a preparação do chocolate

Ingredientes	Concentração (%)
Polidextrose	32,60
Maltitol	15,57
Liquor de cacau	11,20
Manteiga de cacau	21,90
Lecitina de soja	0,30
PGPR 90	0,20
Leite desnatado em pó	7,00
Leite integral em pó	11,00
Aroma de baunilha	0,10
Sucralose	0,03

Fonte: Gomes et al. (2007).

PGPR 90- Poliglicerol Polirricinoleato

Processamento do chocolate

Os chocolates foram produzidos em lotes de 5 quilogramas (kg). Durante o processo de fabricação, primeiramente realizou-se a mistura do líquido de cacau, leite em pó (desnatado e integral), 2/3 da manteiga de cacau, polidextrose e maltitol (agentes de corpo), sucralose (edulcorante de alta intensidade) e o aroma de baunilha. Para esta etapa utilizou-se um misturador planetário encamisado (Inco modelo HTB30, Alemanha) e o processo foi realizado à temperatura ambiente, por um período de 10 a 15 minutos.

A etapa seguinte foi a de refino, sendo utilizado o moinho piloto de três cilindros horizontais (Draiswerk modelo GMBH, Alemanha), para redução do tamanho das partículas dos ingredientes da mistura. Durante o refino foi realizado o monitoramento da granulometria em diferentes porções do refinador.

O chocolate refinado seguiu para a conchagem. Para esta etapa foi utilizado um misturador planetário encamisado (Inco modelo HTB30, Alemanha) com capacidade de 5kg, sendo a conchagem realizada a 60°C por 17 horas. No início dessa etapa foi adicionado o restante da manteiga de cacau e, após 16 horas de tratamento, acrescentou-se a lecitina de soja e o PGPR.

Após 17 horas de conchagem o chocolate foi temperado manualmente, em mesa de mármore, até atingir a temperatura de 28°C, quando então o microrganismo probiótico (livre liofilizado e microencapsulado liofilizado) foi incorporado, em quantidade suficiente para alcançar 10^8 UFC/g no produto pronto para o consumo.

Finalmente, o produto foi moldado em moldes de polietileno com divisões no formato de barras retangulares submetidos à vibração em mesa vibratória (Jafinox, Brasil), para acomodação do chocolate e liberação de bolhas de ar e resfriado em um túnel de resfriamento com ar forçado de oito metros de comprimento (Siaht, modelo TRS, Brasil), durante 12 minutos. A temperatura do ar foi mantida a 12°C no centro e 18°C nas extremidades do túnel (temperatura média de 15°C) (GRUNENVALDT, 2009). Os chocolates foram desmoldados manualmente, embalados em papel alumínio e armazenados em uma câmara BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Fanem, modelo 347 CD, Brasil) a uma temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de 50%, durante 180 dias.

2.2.3 Caracterização do chocolate probiótico

Os diferentes tratamentos foram submetidos a análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, imediatamente após o preparo e durante o período de armazenamento (180 dias).

Análise microbiológica

Amostras de 25 g de chocolate foram homogeneizadas com 225 ml de água peptonada. Diluições seriadas foram preparadas e utilizadas para determinação da viabilidade do microrganismo probiótico e da segurança microbiológica do produto final. A viabilidade do microrganismo probiótico no produto foi avaliada semanalmente. A segurança microbiológica do chocolate foi avaliada um dia após o preparo (T0) e após 90 dias (T90) e 180 dias de estocagem (T180). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular do microrganismo probiótico no produto foi realizada de acordo com procedimento descrito anteriormente, para avaliação das microcápsulas (2.2.1).

Segurança microbiológica

Para a determinação da segurança microbiológica foram avaliados os seguintes grupos ou gêneros/espécies recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 (UFC/g): mesófilos totais - Plate Count Ágar (PCA, Acumedia, EUA), 37°C/48h, aerobiose (FDA, 1995); bactérias do grupo coliformes totais e *E. coli* - placas Petrifilm (3M, Brasil), 37°C/48h, (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001); Clostrídios sulfito redutores - ágar Triptose Sulfito-Cicloserina (TSC, Acumedia, EUA), 37°C/24h, anaerobiose (MARZOTTO et al., 2006); *Staphylococcus aureus* - ágar Baird Parker (Acumedia, EUA), 37°C/48h, aerobiose (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001); pesquisa de *Salmonella* spp. - ágar Hekton-enteric (HE, Acumedia, EUA) e ágar Xylose Lisina Desoxicolato (XLD, Acumedia, EUA), 37°C/24-48h, aerobiose (DOWNES; ITO, 2002) e bolores e leveduras - Potato Dextrose Ágar (PDA, Himedia, Índia), 30°C/3-5 dias, aerobiose (FDA, 1995) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1978).

Determinações físico-químicas

As análises de composição centesimal e das propriedades reológicas foram realizadas uma única vez, imediatamente após o preparo dos produtos. A atividade de água foi monitorada durante todo o período de estocagem (180 dias). A granulometria e o índice de temperagem foram acompanhados durante o processamento do chocolate. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Composição centesimal

Os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos foram determinados segundo metodologia descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença -

carboidratos totais (%) = 100% - (% umidade + cinzas + proteínas + lipídeos) (FUCHS et al., 2005). O valor calórico dos produtos final foi calculado por meio da equação:

VCT (valor calórico total) = [proteínas (g) x 4] + [carboidratos (g) x 4] + [lipídeos (g) x 9].

Determinação de atividade de água

A atividade da água (A_w) foi determinada por medida direta, utilizando-se o aparelho Aqua Lab (Aw43 – ETEC), sendo utilizada uma quantidade de 3 gramas de cada amostra, triturada em cápsula própria para a análise.

Propriedades reológicas - viscosidade plástica de Casson (η_{ca}) e limite de escoamento de Casson (τ_{ca})

As amostras de chocolate foram fundidas a 45°C para determinação das propriedades reológicas. No presente trabalho foi utilizado um reômetro programável, Brookfield, modelo RVDVIII (EUA), com adaptador para pequenas amostras e *spindle* do tipo cilíndrico (S15). Para controle da temperatura ($40 \pm 0,1^\circ\text{C}$) foi utilizado um banho termostático da mesma marca, modelo TC500 (VISSOTTO et al., 1999). As rotações do *spindle* seguiram as recomendações de Vissotto et al. (1997). Após a coleta dos dados foram construídas curvas correlacionando os resultados experimentais de taxa de deformação e tensão de cisalhamento e calculados os parâmetros: viscosidade plástica de Casson (η_{ca}) e limite de escoamento de Casson (τ_{ca}). Os parâmetros de Casson foram determinados por regressão (VISSOTTO et al., 1997).

Granulometria

A granulometria das amostras foi determinada por leitura direta em micrômetro digital (Mitutoyo, Japão), com escala de 0 a 25mm, após o processo de refino. Foram retiradas dez amostras de cada uma das massas de chocolates obtidas. Para cada amostra foram tomadas porções de diferentes regiões, sendo cada porção diluída em óleo mineral puro Nujol® até adquirir uma consistência homogênea (LUCCAS; KIECKBUSCH, 2006).

Índice de temperagem (*Temperindex*)

Para esta análise foi utilizado um temperímetro (SOLLICH- E3, Alemanha), com recipientes próprios para forçar uma cristalização complementar a 8°C.

2.2.4 Avaliação *in vitro* da resistência gastrintestinal da cepa *E. faecium* CRL 183

A avaliação da sobrevivência gastrintestinal do microrganismo probiótico *E. faecium* livre liofilizado (II) e microencapsulado e liofilizado (III) no chocolate, foi realizada no tempo inicial (T0) de acordo com a metodologia descrita por Liserre et al. (2007), Buriti et al. (2010) e Bedani et al (2013), com adaptações. Porções de 25 g de chocolate contendo a cultura probiótica de *E. faecium* livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada foram homogeneizadas com 225 ml de solução salina (NaCl 0,85%). As amostras foram então submetidas à análise de resistência às condições gástrica e entérica simuladas. Esse método é composto por três fases:

-Fase Gástrica: Alíquota de 10,0 ml da amostra (tratamentos II e III) foi adicionada a um meio ácido (pH ~2,0), contendo 0,3 ml de HCl 1N, pepsina da mucosa estomacal de porco (0,1 ml - 3g/l) (Sigma® Aldrich Co., EUA) e lipase do pâncreas suíno (0,01 ml - 0,9mg/l) (Sigma® Aldrich Co., EUA), dissolvidas em NaCl 0,85%. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C em banho de agitação a 150 rpm (TE-053, TECNAL® – Brasil).

-Fase Entérica I: Nesta fase, foi adicionado à solução descrita acima para obtenção do pH alcalino (pH~5,0), 2,4 ml de solução tampão pH 12 (150 ml de NaOH 1N, 10,77g de NaH₂PO₄ e água destilada q.s.p 1 litro), contendo pancreatina (1g/l) (Sigma® Aldrich Co., EUA) e sais biliares (10g/l) (Oxgall Powder, Sigma® Aldrich Co., EUA). As amostras foram reincubadas por 2 horas a 37°C em banho de agitação de 150 rpm.

-Fase Entérica II: À solução citada anteriormente, foi adicionado 3,5 ml da mesma solução descrita na fase entérica I (pancreatina -1g/l + sais biliares - 10g/l, dissolvida em solução tampão pH 12) e o pH foi ajustado para 7,0. Os frascos foram, então, incubados novamente por 2 horas a 37°C, em banho de agitação a 150 rpm, totalizando 6 horas de ensaio.

Após o período de incubação de cada fase foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento em meio M17 (Himedia, Mumbai, Índia), para determinação da viabilidade do microrganismo probiótico *E. faecium*.

2.2.5 Análise sensorial

As amostras foram avaliadas sensorialmente através de testes de aceitação. Os testes sensoriais foram realizados nos tempos 0, 90 e 180 dias de armazenamento. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCF/ UNESP.

Teste de aceitação

No teste de aceitação foram avaliados os atributos de aparência, cor, aroma, textura, sabor e impressão global, sendo utilizada uma escala hedônica estruturada mista de nove pontos (STONE; SIDEL, 1993) (Anexo 1). As amostras (5g) foram apresentadas em recipientes brancos, em blocos completos casualizados, codificados com algarismos de três dígitos e de forma monádica. A equipe foi composta por 112 consumidores não treinados, habituados ao consumo regular de chocolate (HOUGH et al., 2006). Os consumidores, em sua maioria, foram representados por alunos de graduação e pós-graduação, professores e demais colaboradores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Todos os voluntários do estudo concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF – UNESP Araraquara (n° 573.700) (Anexo 2).

Teste de intenção de compra

A intenção de compra foi avaliada através de uma escala de categoria de cinco pontos, variando de certamente compraria a certamente não compraria o produto (MEILGAARD et al., 1999).

2.2.6 Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey (dados paramétricos). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa para análise estatística xlstat, sendo adotado o nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Viabilidade celular da cepa *E. faecium* CRL183 nas formas microencapsulada, microencapsulada e liofilizada e livre liofilizada, durante o armazenamento à temperatura ambiente.

A técnica de microencapsulação tem sido utilizada com o intuito de proteger os microrganismos probióticos de condições adversas e, muitas vezes, necessárias para exercer seu efeito benéfico no hospedeiro (BOSNEA et. al, 2014).

Um método de microencapsulação eficiente deve ser capaz, também, de garantir a sobrevivência do microrganismo probiótico durante as etapas de processamento e armazenamento do produto (BOSNEA et. al, 2014; MARTÍN et al., 2015).

A escolha da técnica de encapsulação mais adequada torna-se difícil, devido aos resultados controversos encontrados na literatura. A utilização de materiais de parede à base de biopolímeros naturais, embora pouco explorados, representam um avanço promissor na técnica de encapsulamento, devido a sua compatibilidade com outros ingredientes dos alimentos e sua ampla disponibilidade a partir de recursos renováveis (BOSNEA et. al, 2014).

Além da microencapsulação, a liofilização, que consiste na redução da atividade de água através da sublimação da água presente no meio, também pode ser utilizada para melhorar a viabilidade de microrganismos probióticos durante o processamento. Bactérias lácticas comerciais são liofilizadas para manter sua viabilidade e atividade (CARDONA et al. 2002).

No presente trabalho foi determinado o número de células viáveis das microcápsulas, antes e após a desidratação, para verificar o efeito do processo de microencapsulação, associado ou não à liofilização, sobre a população de *E. faecium*. Para efeito de comparação, também foi avaliado o comportamento das células de *E. faecium* livres liofilizadas.

Considerando: 1) as recomendações da ANVISA (2008) – “para que um alimento seja considerado probiótico deve apresentar de 10^8 a 10^9 UFC, na recomendação diária do produto pronto para o consumo”; 2) a quantidade de inóculo que poderia ser adicionado ao chocolate sem interferir nas suas propriedades sensoriais e 3) a ingesta diária máxima desse tipo de produto (25 g), (ANVISA, 2003) foi estabelecida como população mínima de microrganismos probióticos $6 \log$ UFC/g. O acompanhamento da viabilidade dos diferentes tratamentos foi realizado até 270 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

A Tabela 2 evidencia que o número de células viáveis diminuiu significativamente, ao longo do tempo, de forma diferente para cada uma das técnicas empregadas ($p \leq 0,05$). A viabilidade das microcápsulas obtidas por coacervação complexa diminuiu gradativamente, sendo que somente após 60 dias de armazenamento observou-se redução de 1,2 ciclos logarítmicos em comparação à população inicial. Após 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente houve uma redução de 2,2 ciclos logarítmicos no número de células viáveis de *E. faecium* (8,69 log UFC/g para 6,44 log UFC/g) e a porcentagem de sobrevivência do probiótico foi de 74,1%. Considerando a população mínima de 6 log UFC/g para potenciais efeitos benéficos, a viabilidade da cepa na forma microencapsulada (não liofilizada) ficou limitada a 90 dias.

As baixas temperaturas e o processo de sublimação da água que ocorrem durante a liofilização são menos prejudiciais para os microrganismos que as temperaturas elevadas utilizadas em outros métodos, como na secagem por *spray drying* (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2007).

No início do estudo, a viabilidade do *E. faecium* na forma livre liofilizada foi superior aos demais tratamentos, provavelmente, por se tratar de uma amostra contendo apenas o microrganismo probiótico, sem os demais materiais utilizados no processo de microencapsulação. Após uma semana de armazenamento observou-se redução de 1,2 ciclos logarítmicos na população de *E. faecium*, e a partir de então houve estabilização na sobrevivência do microrganismo por 120 dias. Apesar da viabilidade do probiótico continuar elevada, até 270 dias, verificou-se uma redução total de 3,6 ciclos logarítmicos (11,56 log UFC/g para 7,99 log UFC/g), durante o período estudado.

As microcápsulas submetidas ao processo de liofilização não exibiram grande variação na viabilidade do microrganismo probiótico durante o período de armazenamento, sendo que após 270 dias verificou-se uma redução inferior a um ciclo log na população de células viáveis (8,81 log UFC/g para 7,89 log UFC/g).

A porcentagem de sobrevivência do probiótico após 270 dias de armazenamento foi aproximadamente 69,1% na forma livre liofilizada e 89,6% na forma microencapsulada e liofilizada, observando-se claramente uma maior taxa de sobrevivência da cepa *E. faecium* encapsulado por coacervação. Os resultados obtidos sugerem que o método de coacervação complexa seguido de liofilização foi mais eficaz em manter a viabilidade da cepa probiótica durante o período de armazenamento à temperatura ambiente, em comparação aos demais métodos avaliados. Esse efeito deve-se, provavelmente, ao fato da microencapsulação conferir

uma proteção extra ao microrganismo, aumentando sua sobrevivência durante o congelamento e a liofilização (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Tabela 2-Viabilidade de *E. faecium* (log UFC/g) na forma microencapsulada, livre liofilizada e microencapsulada e liofilizada, durante o período de armazenamento à temperatura ambiente.

Tempo de armazenamento (dias)	microencapsulada	livre liofilizada	microencapsulada liofilizada
T0	8,69±0,04 ^a	11,56±0,04 ^a	8,81±0,02 ^a
T7	8,54±0,08 ^{bcd}	10,39±0,09 ^{de}	8,71±0,02 ^{ab}
T14	8,60±0,09 ^{abc}	10,17±0,08 ^{ghi}	8,61±0,05 ^{bcd}
T21	8,43±0,03 ^{cd}	10,51±0,02 ^c	8,77±0,06 ^a
T28	8,61±0,03 ^{ab}	10,12±0,06 ^{hi}	8,73±0,03 ^{ab}
T35	8,42±0,04 ^d	10,09±0,02 ⁱ	8,46±0,07 ^{efg}
T42	8,28±0,04 ^e	10,46±0,06 ^{cd}	8,72±0,01 ^{ab}
T49	8,11±0,04 ^f	10,20±0,03 ^{fgh}	8,77±0,03 ^a
T56	8,08±0,01 ^f	10,26±0,02 ^f	8,68±0,06 ^{abc}
T63	7,46±0,04 ^g	10,24±0,02 ^{fg}	8,29±0,04 ^{ijk}
T70	6,91±0,02 ^h	10,18±0,01 ^{fghi}	8,29±0,02 ^{ijk}
T77	6,74±0,07 ⁱ	10,37±0,01 ^e	8,36±0,02 ^{ghij}
T84	6,46±0,03 ^j	10,45±0,01 ^{cde}	8,49±0,02 ^{def}
T91	6,44±0,01 ^j	10,16±0,02 ^{ghi}	8,49±0,02 ^{def}
T98	5,42±0,02 ^k	10,71±0,02 ^b	8,73±0,02 ^{ab}
T105		10,15±0,02 ^{ghi}	8,43±0,01 ^{fgh}
T112		10,73±0,03 ^b	8,21±0,03 ^k
T119		10,73±0,03 ^b	8,21±0,03 ^k
T126		9,77±0,03 ^{jk}	8,77±0,12 ^a
T133		9,84±0,03 ^j	8,24±0,01 ^{jk}
T140		9,85±0,03 ^j	8,01±0,03 ^{lmn}
T147		9,68±0,01 ^{kl}	8,56±0,09 ^{cde}
T154		9,68±0,01 ^{kl}	8,35±0,02 ^{ghij}
T161		9,62±0,01 ^l	8,04±0,03 ^{lm}
T168		9,21±0,01 ^m	8,38±0,02 ^{fghi}
T175		9,62±0,01 ^l	8,26±0,03 ^{ijk}
T182		9,22±0,01 ^m	8,30±0,05 ^{ijk}
T189		9,21±0,01 ^m	8,29±0,02 ^{ijk}
T196		8,90±0,02 ⁿ	8,37±0,03 ^{fghi}
T203		8,90±0,02 ⁿ	8,07±0,02 ^l
T210		8,88±0,02 ⁿ	8,00±0,04 ^{lmn}
T217		8,88±0,02 ⁿ	8,32±0,01 ^{hijk}
T224		8,85±0,03 ⁿ	8,21±0,04 ^k
T231		8,02±0,01 ^o	8,28±0,01 ^{ijk}
T238		8,02±0,01 ^o	8,28±0,01 ^{ijk}
T245		8,01±0,01 ^o	7,92±0,01 ^{mn}
T252		8,02±0,01 ^o	7,93±0,02 ^{mn}
T259		7,99±0,01 ^o	7,89±0,02 ⁿ
T266		7,99±0,02 ^o	7,89±0,01 ⁿ
T273		7,99±0,01 ^o	7,89±0,02 ⁿ

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

Diversos estudos vêm sendo recentemente conduzidos no sentido de testar o desempenho de diferentes culturas probióticas na forma microencapsulada e na forma livre. Bosnea et al. (2014) produziram microcápsulas contendo duas cepas probióticas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (E6) e *Lactobacillus paraplantarum* (B1), utilizando uma mistura de isolado protéico de soro e de goma arábica como materiais de parede. Os autores constataram uma maior viabilidade dos microrganismos quando expostos a um ambiente de pH baixo (pH 2,0) e durante o armazenamento a frio (pH 4,0, 4°C), ao longo de 60 dias de armazenamento, em comparação com as respectivas células livres. Oliveira (2006) produziu microcápsulas contendo *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, utilizando a mistura de caseína/pectina como materiais de parede, seguido de secagem por *spray drying*. A viabilidade da cepa *L. acidophilus* foi mantida a 7°C e 37°C, durante os 120 dias de armazenamento. Por outro lado, *B. lactis* apresentou redução de 4,34 e 6,06 ciclos logarítmicos a 7°C e 37°C respectivamente, após o mesmo período de estocagem.

A maioria dos estudos mostra que baixas temperaturas auxiliam na manutenção da viabilidade do microrganismo probiótico por períodos prolongados. Cardona et. al., (2002) utilizaram um método combinado conhecido como “bomba de calor” (heat pump) para desidratação do *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (LL41-1) e constataram que a viabilidade se mantinha elevada durante a estocagem a -20°C e 4°C, porém sofria rápido declínio a 25°C.

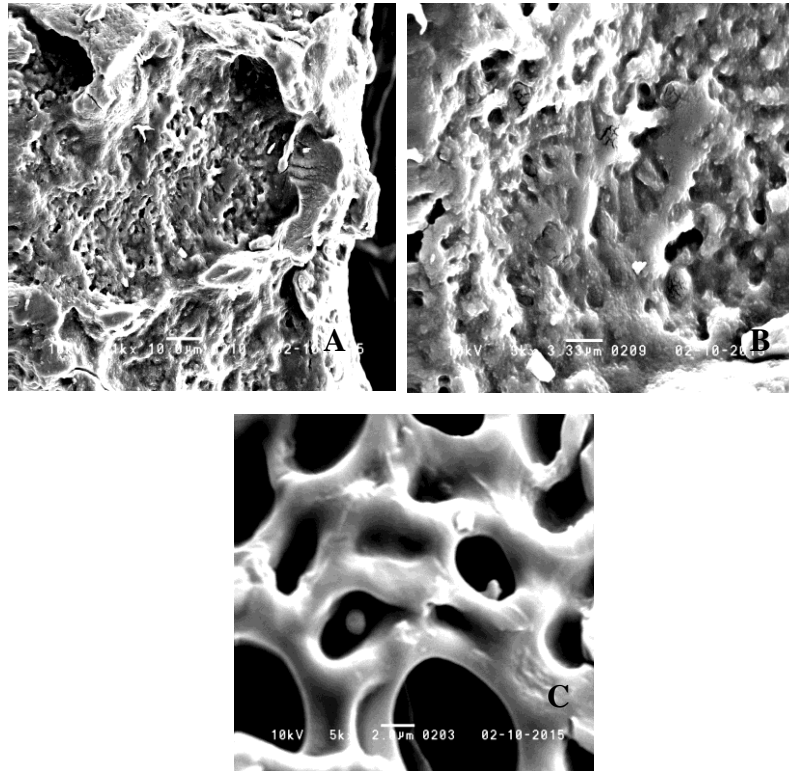
No presente estudo os microrganismos probióticos (encapsulados, liofilizados e microencapsulados e liofilizados) foram armazenados sem controle de temperatura (temperatura ambiente) e resultaram em altas viabilidades durante todo o período de análise, viabilizando a utilização dos mesmos em produtos que não são mantidos sob refrigeração.

3.2 Caracterização morfológica das microcápsulas com cultura probiótica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens evidenciaram que as microcápsulas preparadas por coacervação complexa contendo *E. faecium* e desidratadas pelo processo de liofilização (Figura 1) apresentaram superfícies irregulares, com tamanho e forma variados, cavidades e poros esponjosos, estando unidas umas às outras, formando uma espécie de aglomerado. Park et al. (2005) destacam que a principal desvantagem do método de coacervação é a possibilidade de obtenção de grandes

aglomerados devido à adesão entre as partículas de coacervado, antes que a separação de fases seja finalizada, conferindo assim um aspecto de cápsula inacabada.

Figura 1- Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas liofilizadas produzidas por coacervação complexa contendo *E. faecium*. (A) (1000x), (B) (3000x) e (C) (5000x).



Apesar da característica morfológica das cápsulas, os resultados de viabilidade obtidos indicam que o processo de microencapsulação por coacervação melhorou a resistência do microrganismo probiótico avaliado no presente estudo.

3.3 Caracterização físico-química do chocolate

A determinação das propriedades reológicas, tamanho das partículas e índice de temperagem foi realizada para controle do processo de fabricação do chocolate e as demais análises para caracterização do produto pronto para o consumo.

3.3.1 Propriedades reológicas e granulometria

A Tabela 3 mostra os resultados de viscosidade plástica de Casson (η_{Ca}), limite de escoamento de Casson (τ_{Ca}), coeficiente de determinação (R^2) e tamanho máximo de partículas para os três tratamentos de chocolate. Os tratamentos I e II apresentaram comportamentos semelhantes com relação à viscosidade e escoamento de Casson e diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) do tratamento III.

Tabela 3- Caracterização reológica e tamanho máximo de partículas das formulações

Tratamentos	Viscosidade η_{Ca} (Pa.s)*	Limite de escoamento τ_{Ca} (Pa)*	R^2	Tamanho máximo de partículas (μm)*
I	3,14 \pm 0,10 ^b	0,14 \pm 0,03 ^b	0,9999 ^a	20,00 \pm 0,94 ^a
II	3,01 \pm 0,08 ^b	0,26 \pm 0,08 ^b	1,0000 ^a	20,20 \pm 1,87 ^a
III	5,17 \pm 0,12 ^a	0,54 \pm 0,03 ^a	1,0000 ^a	20,80 \pm 2,86 ^a

*Médias \pm desvio padrão dos tratamentos. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

I: chocolate controle, sem adição de probiótico; **II:** chocolate com adição de *E. faecium* na forma livre, liofilizada; **III:** chocolate com adição de *E. faecium* microencapsulado e liofilizado

O monitoramento dos parâmetros reológicos do chocolate durante o processamento é importante, pois estão relacionados à eficiência das etapas do processo de fabricação, a qualidade final e a característica sensorial do produto (GLICERINA et al., 2013). Fatores como, emulsificantes, conteúdo de gordura, granulometria, teor de umidade, tempo de conchagem e altas temperaturas, afetam diretamente propriedades reológicas importantes para obtenção de chocolates com alta qualidade e textura bem definida (GLICERINA et al., 2013; GONÇALVES; LANNES, 2010). Modificações na composição da massa de chocolate alteram seus parâmetros reológicos. Por exemplo, a substituição da sacarose por um edulcorante geralmente aumenta a viscosidade de Casson da massa de chocolate (ZYŻELEWICZ et al., 2010).

No presente estudo, a adição do probiótico microencapsulado e liofilizado no chocolate III causou um aumento nos valores de viscosidade e escoamento de Casson. A coacervação complexa consiste em uma solução de hidrocolóides (proteína/polissacarídeo), que pode ter influenciado na conservação da estrutura e nos valores de viscosidade (KESTER

et al., 1986). Resultados similares foram encontrados no estudo de Foong et al., (2013) e Zyzelewicz et al., (2010) que observaram que a adição do probiótico liofilizado no chocolate também aumentou os valores dos parâmetros reológicos do produto.

Para Zyzelewicz et al. (2010) a viscosidade das massas de chocolate amargo destinados à fabricação de barras de chocolate deve ser em torno de 2,0 Pa.s. Vissotto et al (2005) produziram 13 formulações de chocolate dietético com variação no tipo e quantidade de agentes de corpo utilizados. Os tratamentos que utilizaram manitol e povidexose como agentes de corpo apresentaram η_{ca} entre 4,48 e 8,85 Pa.s e τ_{Ca} entre 0,05 e 0,26 Pa.s, valores semelhantes aos verificados para os chocolates obtidos no presente estudo. De acordo com Gomes et al., (2007) e Zyzelewicz et al., (2010), de modo geral os baixos valores de escoamento de Casson encontrados em algumas formulações devem-se ao uso de PGPR, um forte agente emulsificante.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos variaram de 0,99 a 1,00 nas formulações, indicando bom ajuste do modelo aos dados experimentais e confirmando o comportamento reológico adequado nos chocolates.

O tamanho máximo de partículas é um dos parâmetros de controle de processo na fabricação do chocolate (LUCCAS, 2001). Quanto menor o tamanho das partículas, mais homogêneas são as massas obtidas e menor a sensação de arenosidade no chocolate, sendo que, valores superiores a 25 μm são perceptíveis ao paladar (GOMES et al., 2007; MELLO, 2005). Após o processo de refino, foram retiradas dez amostras de cada uma das massas de chocolates obtidas, para determinação do diâmetro máximo das partículas. Os valores variam de 20,0 a 20,8 μm (Tabela 3), estando dentro dos padrões de fabricação de chocolates adotado nas indústrias (20 a 25 μm) (LUCCAS, 2001).

3.3.2 Índice de temperagem (*Temperindex*)

O índice de temperagem está relacionado ao grau de cristalização da amostra, através da curva de resfriamento e, por comparação com curvas-padrão, tem-se uma indicação do grau de temperagem do produto. A forma da curva está relacionada à quantidade de calor latente de cristalização liberada durante o resfriamento da massa de chocolate (LUCCAS, 2001).

Os valores do Índice de Temperagem das formulações no presente estudo foram 5,0 (dados não apresentados). Esse índice qualifica o processo de pré-cristalização em sub-temperado (*Temperindex* inferior a 5,0), adequadamente temperado (*Temperindex* igual a 5,0)

e sobre-temperado (Temperíndice superior a 5,0). Dessa forma, os valores obtidos no presente estudo estão de acordo com o estabelecido para chocolates adequadamente temperados (LUCCAS, 2001; SOLLICH, 2001).

3.3.3 Composição centesimal

A legislação brasileira (ANVISA, 1978) estabelece que produtos denominados chocolate, prontos para o consumo, devem apresentar teor máximo de 68% de carboidratos, 2,5% de cinzas e 3% de umidade e uma concentração mínima de 20% de lipídios totais. A Tabela 4 mostra que os resultados da composição centesimal atendem aos parâmetros recomendados pela legislação e não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os três tratamentos, para todos os parâmetros analisados.

Segundo a legislação, os chocolates obtidos podem ser considerados *diet* já que possuem substituição total da sacarose por edulcorante de alta intensidade (sucralose) e agentes de corpo (maltitol/polidextrose) (ANVISA, 1998). A sacarose possui valor calórico de 4,0 kcal/g, em contraste com os agentes de corpo polióis (2,4 kcal/g) e polidextrose (1 kcal/g), utilizados no produto. Considerando a quantidade de polióis e polidextrose adicionados à formulação, a ausência de sacarose não reduziu o valor calórico final dos produtos. Os chocolates obtidos no presente estudo apresentaram valores calóricos entre 537,41 e 544,80 kcal/100g, e composição centesimal semelhante às verificadas em produtos de marcas comerciais, produzidos com e sem adição de sacarose. (TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS, 2006).

Tabela 4- Teores médios da composição centesimal dos diferentes tratamentos de chocolate

	Tratamentos		
	I	II	III
Proteínas (%)	6,67±0,10 ^a	6,64±0,33 ^a	7,03±0,17 ^a
Lipídeos (%)	32,44±1,37 ^a	31,14±1,49 ^a	30,89±2,39 ^a
Carboidratos (%)	56,54±1,22 ^a	58,15±1,72 ^a	57,82±2,41 ^a
Cinzas (%)	1,62±0,14 ^a	1,56±0,02 ^a	1,77±0,06 ^a
Umidade (%)	2,74±0,13 ^a	2,51±0,10 ^a	2,50±0,21 ^a
kcal (kcal/100g)	544,80±7,62 ^a	539,42±7,09 ^a	537,41±11,27 ^a

Médias (\pm desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). **I:** chocolate controle, sem adição de probiótico; **II:** chocolate com adição de *E. faecium* na forma livre, liofilizada; **III:** chocolate com adição de *E. faecium* microencapsulado e liofilizado.

3.3.4 Determinação da atividade de água (A_w)

A atividade de água das formulações foi avaliada durante todo período de estocagem e os resultados são apresentados na Tabela 5. Embora tenham sido detectadas diferenças significativas nos valores de atividade de água ao longo do período de armazenamento, para cada formulação estudada ($p < 0,05$), a comparação entre os tempos inicial (T0) e final (T180) evidencia que esse parâmetro se manteve estável. A variação na atividade de água observada durante o estudo, deve-se, provavelmente, à falta de homogeneidade das amostras.

A legislação brasileira não estabelece padrão para o parâmetro atividade de água para chocolates. Outros estudos mostram que os valores de atividade de água podem variar em função do tipo de produto e do processamento. Nebesny et al. (2007) encontraram valores entre 0,12 e 0,20 para chocolates armazenados à 4°C e 18°C por 12 meses, enquanto Foong et al. (2013) verificaram que a atividade de água de chocolates armazenados à 4°C, por um período de três meses, variava de 0,45-0,70.

Segundo Marshal et al. (1973), a atividade de água é um dos principais fatores que contribuem para diminuição e/ou manutenção da viabilidade de microrganismos liofilizados ao longo do período de armazenamento, e o aumento da atividade de água pode reduzir a viabilidade da cultura probiótica. Konar et al. (2014) encontraram uma atividade de água entre 0,26 e 0,34 para chocolates prebióticos. Em geral, a baixa atividade de água (normalmente de 0,40) de chocolates se deve à sua composição (KONAR et al., 2014; ROSSINI et al., 2011; VERCET, 2003).

Tabela 5- Teores médios de atividade de água (Aw) nas amostras de chocolate segundo tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo de armazenamento(dias)	Tratamentos		
	I	II	III
T0	0,34±0,01 ^{aABC}	0,35±0,02 ^{aABC}	0,34±0,01 ^{aAB}
T7	0,33±0,04 ^{aABC}	0,30±0,03 ^{aBCD}	0,30±0,03 ^{aCD}
T14	0,28±0,02 ^{aBC}	0,25±0,01 ^{aD}	0,30±0,04 ^{aCD}
T21	0,34±0,02 ^{aABC}	0,34±0,02 ^{aABC}	0,32±0,03 ^{aBCD}
T28	0,36±0,03 ^{aAB}	0,37±0,06 ^{aAB}	0,33±0,04 ^{aBCD}
T35	0,30±0,03 ^{aABC}	0,31±0,02 ^{aBCD}	0,29±0,02 ^{aD}
T42	0,26±0,03 ^{aC}	0,27±0,05 ^{aCD}	0,26±0,02 ^{aD}
T49	0,33±0,04 ^{aABC}	0,32±0,03 ^{aBCD}	0,30±0,02 ^{aCD}
T56	0,34±0,03 ^{aABC}	0,29±0,05 ^{aBCD}	0,29±0,04 ^{aD}
T63	0,36±0,03 ^{bAB}	0,41±0,01 ^{abA}	0,42±0,02 ^{aA}
T70	0,36±0,03 ^{bAB}	0,41±0,01 ^{abA}	0,42±0,02 ^{aA}
T77	0,36±0,02 ^{aAB}	0,34±0,05 ^{aABCD}	0,29±0,03 ^{aCD}
T84	0,36±0,02 ^{aAB}	0,34±0,05 ^{aABCD}	0,29±0,03 ^{aCD}
T91	0,37±0,05 ^{aA}	0,33±0,03 ^{aABCD}	0,33±0,05 ^{aBCD}
T98	0,36±0,02 ^{aAB}	0,37±0,01 ^{aAB}	0,34±0,04 ^{aABCD}
T105	0,36±0,02 ^{aAB}	0,37±0,01 ^{aAB}	0,34±0,04 ^{aABCD}
T112	0,33±0,04 ^{aABC}	0,32±0,03 ^{aBCD}	0,30±0,02 ^{aCD}
T119	0,33±0,04 ^{aABC}	0,32±0,03 ^{aBCD}	0,30±0,02 ^{aCD}
T126	0,39±0,01 ^{aA}	0,30±0,01 ^{bBCD}	0,41±0,01 ^{aAB}
T133	0,39±0,01 ^{aA}	0,30±0,01 ^{bBCD}	0,41±0,01 ^{aAB}
T140	0,36±0,02 ^{aAB}	0,37±0,01 ^{aAB}	0,34±0,04 ^{aABCD}
T147	0,39±0,03 ^{aA}	0,35±0,01 ^{abABC}	0,34±0,02 ^{bABCD}
T154	0,39±0,01 ^{aA}	0,30±0,01 ^{bBCD}	0,41±0,01 ^{aAB}
T161	0,39±0,03 ^{aA}	0,35±0,01 ^{abABC}	0,34±0,02 ^{bABCD}
T168	0,39±0,03 ^{aA}	0,35±0,01 ^{abABC}	0,34±0,02 ^{bABCD}
T175	0,39±0,02 ^{aA}	0,36±0,02 ^{aABC}	0,34±0,04 ^{aABCD}
T182	0,35±0,01 ^{aAB}	0,37±0,01 ^{aAB}	0,38±0,02 ^{aABC}

Médias (\pm desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Médias (\pm desvio padrão) seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

I: chocolate controle, sem adição de probiótico;

II: chocolate com adição de *E. faecium* na forma livre, liofilizada;

III: chocolate com adição de *E. faecium* microencapsulado e liofilizado.

3.4 Caracterização microbiológica do chocolate

3.4.1 Segurança microbiológica

Segundo recomendações da ANVISA (Resolução - CNNPA nº 12, de 1978), o chocolate deve possuir no máximo 5×10^4 UFC/g de bactérias mesófilas totais, 10^2 UFC/g de coliformes totais, 2×10^1 UFC/g de Clostrídios sulfito redutores, 10^3 UFC/g de bolores e leveduras, ausência de *E. coli* em 1g, ausência de *Staphylococcus aureus* em 0,1g e ausência de *Salmonella* spp. em 25g. Observa-se na Tabela 6 que os três tratamentos de chocolate atenderam aos parâmetros recomendados pela legislação brasileira.

A segurança microbiológica do chocolate se deve à qualidade da matéria-prima, do processamento, a baixa atividade de água do produto e à correta manutenção desse parâmetro durante o período de estocagem. Nesse sentido, a utilização de embalagem adequada é fundamental, já que alguns ingredientes, como os agentes de corpo maltitol e polidextrose, possuem alta capacidade higroscópica e poderiam favorecer a absorção da umidade durante o período de estocagem (GOMES et al., 2007).

Tabela 6- Resultados das análises microbiológicas dos diferentes tratamentos de chocolate

Tempo de armazenamento	Tratamentos		
	I	II	III
T0			
Contagem padrão em placas (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
Coliformes totais e <i>E. coli</i> (UFC/g)	ausente	ausente	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<1,0	<1,0	<1,0
Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
<i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	ausente	ausente	ausente
Contagem de bolores/leveduras (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
T90			
Contagem padrão em placas (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
Coliformes totais e <i>E. coli</i> (UFC/g)	ausente	ausente	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<1,0	<1,0	<1,0
Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
<i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	ausente	ausente	ausente
Contagem de bolores/leveduras (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
T180			
Contagem padrão em placas (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
Coliformes totais e <i>E. coli</i> (UFC/g)	ausente	ausente	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<1,0	<1,0	<1,0
Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0
<i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	ausente	ausente	ausente
Contagem de bolores/leveduras (UFC/g)	< 10,0	< 10,0	< 10,0

I: chocolate controle, sem adição de probiótico

II: chocolate com adição de *E. faecium* na forma livre, liofilizada

III: chocolate com adição de *E. faecium* microencapsulado e liofilizado

3.4.2 Determinação da viabilidade celular do microrganismo probiótico (*E. faecium* CRL 183) no chocolate

A Tabela 7 mostra que, independentemente do tratamento, houve alterações significativas ao longo do tempo ($p < 0,05$). No entanto, tanto no chocolate com adição do microrganismo na forma livre liofilizada (II), como no chocolate com adição da cepa microencapsulada e liofilizada (III), não se verificou alteração logarítmica na população inicial. A variação da viabilidade ao longo do período de armazenamento, deve-se, provavelmente, à dificuldade de incorporar o probiótico de forma homogênea ao chocolate. Cabe salientar que a população inicial do microrganismo probiótico no tratamento II foi superior, pois o inóculo utilizado (*E. faecium* CRL 183 livre liofilizado) encontrava-se mais concentrado (11 log UFC/g), em comparação ao microencapsulado liofilizado (9 log UFC/g).

Tabela 7- Viabilidade celular (log UFC/g) do microrganismo probiótico (*E. faecium* CRL 183) no chocolate, na forma livre liofilizada e microencapsulada liofilizada, durante o armazenamento a 25°C.

Tempo de armazenamento (dias)	Tratamentos	
	II (probiótico liofilizado)	III (probiótico microencapsulado e liofilizado)
T0	8,40±0,01 ^{ghi}	7,15±0,04 ^{hij}
T7	8,61±0,06 ^{bcd}	7,45±0,03 ^{bc}
T14	8,40±0,02 ^{ghi}	7,11±0,02 ^j
T21	8,71±0,01 ^{abc}	7,42±0,01 ^{cd}
T28	8,81±0,01 ^a	7,21±0,02 ^{fghi}
T35	8,52±0,02 ^{defg}	7,29±0,01 ^{ef}
T42	8,38±0,01 ^{ghi}	7,30±0,02 ^{ef}
T49	8,55±0,09 ^{def}	7,66±0,05 ^a
T56	8,72±0,03 ^{ab}	7,23±0,01 ^{fgh}
T63	8,49±0,03 ^{efgh}	7,16±0,03 ^{hij}
T70	8,70±0,05 ^{abc}	7,27±0,03 ^{efg}
T77	8,60±0,05 ^{cde}	7,19±0,02 ^{ghij}
T84	8,45±0,02 ^{fghi}	7,18±0,04 ^{ghij}
T91	8,46±0,01 ^{fghi}	7,11±0,05 ^j
T98	8,46±0,01 ^{fghi}	7,11±0,05 ^j
T105	8,77±0,06 ^a	7,51±0,03 ^b
T112	8,59±0,09 ^{cde}	7,11±0,02 ^j
T119	8,45±0,01 ^{fghi}	7,25±0,03 ^{fgh}
T126	8,59±0,09 ^{cde}	7,11±0,02 ^j
T133	8,45±0,01 ^{fghi}	7,25±0,03 ^{fgh}
T140	8,56±0,03 ^{def}	7,14±0,01 ^{ij}
T147	8,58±0,01 ^{def}	7,25±0,01 ^{fgh}
T154	8,55±0,03 ^{def}	7,35±0,01 ^{de}
T161	8,42±0,02 ^{ghi}	7,25±0,02 ^{fgh}
T168	8,39±0,03 ^{ghi}	7,16±0,06 ^{hij}
T175	8,38±0,01 ^{hi}	7,12±0,03 ^j
T182	8,35±0,01 ⁱ	7,10±0,01 ^j

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

Atualmente a legislação brasileira recomenda, com base na porção diária do alimento, concentração mínima de células viáveis de 10^8 a 10^9 UFC/g (ANVISA, 2008). No presente estudo, o consumo diário de 10g de chocolate (tratamentos II e III) seriam suficientes para respeitar a recomendação da ANVISA e para que os potenciais efeitos benéficos do produto sejam observados.

Os resultados deste trabalho quanto à sobrevivência do microrganismo probiótico no chocolate vêm corroborar com os dados da literatura que mostram que o chocolate é uma boa matriz para a incorporação de probióticos, em comparação com os produtos lácteos. Vários autores observaram alta estabilidade e viabilidade dos microrganismos probióticos em chocolates, utilizando diferentes microrganismos e técnicas de microencapsulação. Nebesny et al. (2007) utilizaram cepas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* para produção de chocolate probiótico e o produto se manteve estável durante 12 meses de armazenamento a 4°C e 18°C. Cepas probióticas microencapsuladas de *Lactobacillus helveticus* CNCM I-1722 e *Bifidobacterium longum* CNCM I-3470 obtiveram uma taxa de sobrevivência de 91% e 80%, respectivamente, quando incorporados em chocolates tipo ao leite e amargo (POSSEMIERS et al. 2010). No estudo de Mandal et al. (2012), cepas de *Lactobacillus casei* NCDC 298, tanto na forma livre como encapsulada, apresentaram excelente viabilidade (superior a 8,0 log UFC/g) quando incorporadas em chocolate ao leite, durante o armazenamento por 60 dias, sob condições de refrigeração. No estudo conduzido por Foong et al. (2013), os autores isolaram uma cepa de *Lactobacillus plantarum*, a partir de grãos de cacau fermentado, que foi posteriormente incorporada em chocolate tipo amargo. Após três meses de armazenamento refrigerado a 4°C, constatou-se uma diminuição na contagem de células viáveis (8,0 log UFC / g a 6,5 log UFC / g) e uma taxa de sobrevivência de cerca de 81,25%. Em um estudo recente, Lalicic'-Petronijevic' et al., (2015) obtiveram resultados semelhantes aos nossos durante o período de armazenamento de 180 dias. Os autores investigaram a viabilidade de cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* NCFM® e *Bifidobacterium lactis* HN019 incorporadas em chocolates do tipo amargo e ao leite, mantidos a 4°C e 20°C. A cepa probiótica *L. acidophilus* NCFM® apresentou população de células viáveis superior a da cepa *B. lactis* HN019 em ambos os tipos de chocolates e a temperatura de 4°C favoreceu a manutenção da viabilidade.

Cabe salientar que, na maioria dos trabalhos realizados, o chocolate foi mantido sob refrigeração durante o período de estocagem, auxiliando assim na manutenção da viabilidade da cepa probiótica. No presente estudo, a taxa de sobrevivência do microrganismo *E. faecium* CRL 183 no chocolate, após 180 dias de armazenamento à 25°C, foi de 100%, confirmando

que o produto pode ser armazenado à temperatura ambiente, sem prejuízo de sua funcionalidade.

A vida de prateleira de um alimento é o período de tempo no qual este alimento mantém as características de aparência, aroma, sabor e textura aceitáveis, as quais vão depender de diversos parâmetros como, a temperatura de armazenamento e umidade, a disponibilidade imediata de oxigênio no ambiente, o material de embalagem a ser utilizado e a adição de outros ingredientes, tais como, gorduras (NORHAYATI et al., 2013).

Normalmente, os chocolates comerciais têm uma vida de prateleira de 12 meses e, em geral, são reconhecidos como microbiologicamente, quimicamente e organolepticamente estáveis (NORHAYATI et al., 2013). No presente estudo os chocolates foram obtidos em uma planta piloto, em escala laboratorial, e por isso, a estabilidade dos produtos frente ao período de estocagem deve ser menor. Os resultados das análises microbiológicas evidenciaram que todos os tratamentos permaneceram estáveis e seguros por, no mínimo, seis meses de armazenamento à temperatura ambiente.

Em geral, chocolates com probióticos oferecem duplo benefício: uma extensa vida de prateleira quando comparado aos produtos probióticos tradicionais e já consagrados no mercado e uma melhor proteção aos probióticos durante o trânsito gastrintestinal, devido principalmente ao seu alto teor de gordura (LALICIC´-PETRONIJEVIC´ et al., 2015; MAILLARD; LANDUYT, 2008; POSSEMIERS et al., 2010).

3.5 Avaliação *in vitro* da resistência gastrintestinal da cepa *E. faecium* CRL 183

A viabilidade da cepa *E. faecium*, adicionada ao chocolate e submetida às condições gástricas e entéricas simuladas imediatamente após o preparo, é apresentada na Tabela 8.

No presente trabalho, as células de *E. faecium* na forma livre liofilizada sofreram redução de três ciclos logarítmicos no final da fase gástrica. Por ourto lado, a população de *E. faecium* microencapsulado e liofilizado se mostrou mais resistente, com redução de dois ciclos logarítmicos, após contato com as condições simuladas do estômago.

O probiótico livre liofilizado manteve-se estável nas fases entéricas I e II, sem redução logarítmica na população de *E. faecium*, enquanto a cepa microencapsulada e liofilizada sofreu redução de 0,75 log UFC/g na fase entérica I, com posterior recuperação de viabilidade na fase entérica II.

No final do experimento, observou-se uma maior porcentagem de sobrevivência do probiótico na forma microencapsulada e liofilizada (72,71%), quando comparada à forma livre liofilizada (65,61%), indicando que o processo de microencapsulação aumenta a resistência da cepa *E. faecium* durante a passagem pelo trato gastrintestinal colaborando para que os possíveis efeitos benéficos sejam observados.

Alguns autores também mostraram resultados que indicam que a microencapsulação pode proteger os microrganismos probióticos contra as condições adversas do ambiente gastrintestinal, quando comparados aos microrganismos na forma livre (MANDAL et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; PIĄTEK et al., 2012; SULTANA et al., 2000).

Tabela 8- Viabilidade do *E. faecium* (log UFC/g) presentes no chocolate durante exposição sequencial as condições gástricas e entéricas simuladas no tempo inicial (T0) de armazenamento.

Incubação sequencial	Tratamentos		
	Tempo (horas)	II (probiótico liofilizado)	III (probiótico microencapsulado e liofilizado)
	0h	8,55±0,09 ^{aA}	7,66±0,05 ^{bA}
Fase Gástrica	2h	5,60±0,05 ^{aB}	5,57±0,09 ^{aC}
Fase Entérica I	4h	5,63±0,01 ^{aB}	4,82±0,10 ^{bD}
Fase Entérica II	6h	5,54±0,02 ^{bB}	5,85±0,03 ^{aB}

Médias (\pm desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

Médias (\pm desvio padrão) seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

A resistência de microrganismos probióticos à ação do suco gástrico e da bile, envolvidos no processo digestivo, é um pré-requisito para a sua adição em uma matriz alimentar. Os testes *in vitro* são frequentemente sugeridos para avaliar o potencial da cepa probiótica sob condições gastrintestinais, embora não sejam os melhores para comprovar a funcionalidade da cepa no organismo humano (BURITI et al., 2010), já que utilizam sucos gástricos simulados ou artificiais, bile bovina ou suína e outros extratos pancreáticos animais (DEL PIANO et al., 2006). No Brasil, um dos requisitos para a comprovação da eficácia de um microrganismo é a inclusão de testes de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (ANVISA, 2008).

O principal desafio na sobrevivência dos probióticos é a bile, responsável por causar danos na membrana dos microrganismos e/ou a interrupção da estabilidade da célula,

causando estresse oxidativo ao DNA. Em geral, as bactérias Gram-positivas parecem resistir menos aos efeitos prejudiciais dos sais biliares. A concentração de ácidos biliares é variável de uma pessoa para outra e os ensaios *in vitro* ainda não são capazes de simular a composição exata da bile encontrada em seres humanos (BEGLEY et al., 2005; SILVA et al., 2015). Em adição à tolerância aos sais biliares, os microrganismos probióticos devem antes resistir e sobreviver às condições ácidas do ambiente gástrico humano, já que os valores de pH variam de 1,5 a 3,5, e assim, aderir à mucosa do epitélio intestinal e colonizar o ecossistema microbiano, a fim de competir com os organismos patogênicos (HUANG et al., 2014).

3.6 Caracterização sensorial do chocolate

3.6.1 Análise sensorial

A avaliação sensorial é imprescindível e obrigatória antes da comercialização de produtos contendo probióticos, pois os ingredientes, a cepa utilizada, o tipo de processamento e as condições de armazenamento podem alterar as propriedades sensoriais do produto e influenciar o seu sucesso comercial (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013). Apesar da microencapsulação melhorar a resistência das cepas probióticas há a necessidade de desenvolver novas tecnologias ou equipamentos que produzam partículas uniformes e menos perceptíveis para aplicações industriais (MARTÍN et al., 2015)

De modo geral, os diferentes tratamentos obtiveram médias de aceitação entre 7,0 e 8,2, correspondentes a “gostei moderadamente” e “gostei muito”, respectivamente, na escala hedônica utilizada (Tabela 9).

No tempo inicial (T0) não foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para os atributos aparência, cor, aroma e sabor. Em relação aos atributos textura e impressão global, o tratamento com adição do microrganismo na forma livre liofilizada (II) obteve a maior média de aceitação, sem diferir estatisticamente da formulação controle (I - sem adição de probiótico). O chocolate com adição do microrganismo microencapsulado e liofilizado (III) obteve a menor média para o atributo textura, provavelmente porque as cápsulas de probióticos foram percebidas sensorialmente como grânulos, afetando a uniformidade do produto. Nota-se também que o comportamento reológico desta formulação demonstrou o maior valor de viscosidade, que pode contribuir para piores atributos sensoriais do chocolate (ŻYŻELEWICZ et al., 2010). Gonçalves e Lannes (2010) relataram que o sabor

de um chocolate na boca é afetado por sua viscosidade, já que as propriedades de fluidez podem ser percebidas pelo consumidor.

Após 90 dias de armazenamento, o chocolate com adição do microrganismo microencapsulado e liofilizado (III) apresentou menores médias de aceitação para aparência, cor, sabor e textura, diferindo dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Para o atributo impressão global o tratamento III também foi o menos aceito, no entanto, não diferiu estatisticamente do chocolate controle.

Tabela 9- Médias de aceitação de cada atributo avaliado nos diferentes tratamentos ao longo do período de armazenamento à 25°C (n=112).

Tempo	Tratamentos		
	I	II	III
T0			
Aparência	8,14±0,96 ^{aA}	8,20±0,83 ^{aA}	7,96±1,03 ^{aA}
Cor	8,24 ±0,87 ^{aA}	8,28±0,74 ^{aA}	8,05±0,91 ^{aA}
Aroma	7,87±1,06 ^{aA}	7,67±1,08 ^{aA}	7,76±1,05 ^{aA}
Sabor	7,70±1,14 ^{aA}	7,80±1,10 ^{aA}	7,53±1,22 ^{aA}
Textura	7,30±1,36 ^{abA}	7,49±1,30 ^{aA}	6,96±1,51 ^{bA}
Impressão Global	7,73±1,00 ^{abA}	7,86±0,96 ^{aA}	7,51±1,22 ^{bA}
T90			
Aparência	8,06±0,88 ^{aA}	8,03±0,97 ^{aA}	7,62±1,27 ^{bA}
Cor	8,13±0,94 ^{aA}	8,13±0,89 ^{aA}	7,79±1,15 ^{bA}
Aroma	7,52±1,26 ^{aA}	7,60±1,37 ^{aA}	7,23±1,43 ^{aB}
Sabor	7,68±1,27 ^{aA}	7,80±1,09 ^{aA}	7,27±1,25 ^{bA}
Textura	7,50±1,42 ^{aA}	7,46±1,38 ^{aA}	7,01±1,39 ^{bA}
Impressão Global	7,68±1,15 ^{abA}	7,80±0,97 ^{aA}	7,34±1,11 ^{bA}
T180			
Aparência	8,17±0,78 ^{aA}	8,15±0,88 ^{aA}	7,83±1,04 ^{bA}
Cor	8,23±0,75 ^{aA}	8,17±0,90 ^{aA}	7,88±1,03 ^{bA}
Aroma	7,72±1,20 ^{aA}	7,76±1,06 ^{aA}	7,44 ±1,31 ^{aAB}
Sabor	7,65±1,11 ^{abA}	7,76±1,10 ^{aA}	7,34±1,44 ^{bA}
Textura	7,35±1,43 ^{abA}	7,62±1,31 ^{aA}	6,92±1,61 ^{bA}
Impressão Global	7,71±1,11 ^{abA}	7,87±0,95 ^{aA}	7,38±1,29 ^{bA}

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

I: chocolate controle, sem adição de probiótico

II: chocolate com adição de *E. faecium* na forma livre, liofilizada

III: chocolate com adição de *E. faecium* microencapsulado e liofilizado

Foi observada uma tendência de menores médias para o chocolate adicionado do microrganismo probiótico microencapsulado e liofilizado (III) quando comparado aos outros tratamentos após 180 dias de armazenamento. Este tratamento continuou a exibir as menores médias de aceitação para os atributos aparência e cor, diferindo dos demais tratamentos ($p < 0,05$). No entanto, para os atributos, sabor, textura e impressão global, não constatou-se diferença estatística em relação ao chocolate controle (I).

A adição de probióticos em alimentos lácteos e não lácteos pode modificar seus atributos sensoriais, tornando-se um dos grandes obstáculos enfrentados ultimamente pela indústria alimentícia (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013).

Ribeiro et al. (2014) observaram que não houve diferença significativa para os atributos, aroma, sabor e impressão global entre amostras de iogurte com adição de cepas probióticas nas formas livre e encapsulada. No entanto, no que diz respeito ao atributo de textura, o iogurte contendo *L. acidophilus* LA-5 encapsulado foi menos aceito (6,68) que o iogurte contendo células livres de *L. acidophilus* LA-5 (7,33), sugerindo que o tamanho da partícula foi percebido pelos consumidores, afetando negativamente a aceitação do produto. Por outro lado, a adição do probiótico microencapsulado não alterou os atributos sensoriais de chocolates descritos em outros estudos (Mandal et al., 2012 e Nebesny et al., 2007). Os bons resultados obtidos podem estar relacionados a uma melhor eficácia do processo de encapsulação dos probióticos, deixando-os imperceptíveis para os consumidores.

No presente estudo, a adição do microrganismo microencapsulado e liofilizado alterou a aceitação do produto, enquanto a forma livre liofilizada não foi percebida de forma negativa pelos consumidores. Uma alternativa viável para reduzir a percepção dos grânulos seria a adição de flocos de arroz ou castanhas, conferindo ao produto a característica de “chocolate crocante”.

3.6.2 Teste de intenção de compra

Os resultados do teste de intenção de compra dos consumidores podem ser visualizados na Figura 2.

A avaliação da intenção de compra, realizada imediatamente após o preparo dos produtos, confirmou os resultados obtidos no teste de aceitação utilizando escala hedônica, uma vez que 81,25%, 85,71% e 72,31% dos consumidores, certamente ou provavelmente comprariam os produtos I, II e III, respectivamente. O chocolate com adição da cepa na forma microencapsulada e liofilizada (III) obteve a maior manifestação negativa quanto à intenção

de compra, com 4,45% dos consumidores afirmando que provavelmente ou certamente não comprariam o produto. Vale destacar que somente 0,89% dos consumidores não manifestaram interesse na compra do chocolate com adição do microrganismo na forma livre liofilizada (II).

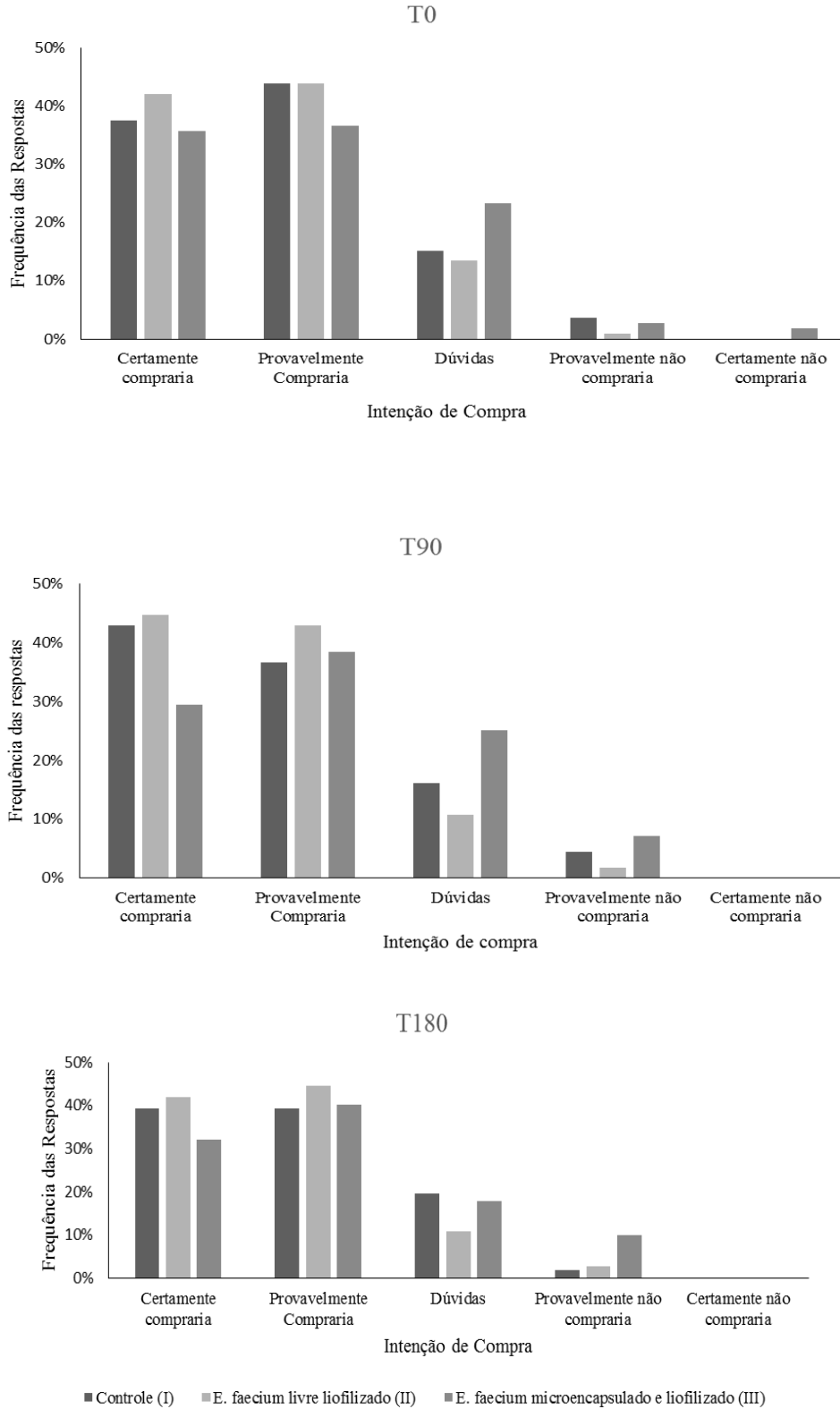
Após 90 dias de armazenamento o tratamento II continuou a exibir a melhor intenção de compra em comparação aos demais tratamentos (I: 79,45%; II: 87,49% e III: 67,85% dos consumidores certamente ou provavelmente comprariam o produto). A porcentagem de rejeição dos produtos aumentou para todos os tratamentos, com 4,46%, 1,78% e 7,14% dos consumidores afirmando que certamente ou provavelmente não comprariam os chocolates I, II e III, respectivamente.

As porcentagens de intenção de compra positiva permaneceram entre 78,56%, 86,6% e 72,31% para os chocolates I, II e II, respectivamente ao final de 180 dias de armazenamento. A maior porcentagem de indiferença (dúvidas se compraria ou não o produto) foi para o tratamento controle (I - 19,64%, seguido do *E. faecium* microencapsulado (III - 17,85%). A porcentagem de rejeição dos consumidores que certamente ou provavelmente não comprariam os chocolates, continuou a aumentar para os tratamentos II (2,67%) e III (9,82%) e diminuiu para o tratamento controle (1,78%).

No estudo de Ribeiro et al. (2014), a menor aceitação para o atributo textura do iogurte microencapsulado com *L. acidophilus* LA-5 não resultou em diferenças na intenção de compra dos produtos.

Os resultados obtidos evidenciaram que, apesar da adição do probiótico na forma microencapsulada e liofilizada alterar a percepção sensorial do chocolate, principalmente em relação à textura, todos os tratamentos avaliados apresentaram bom potencial para serem introduzidos no mercado, com intenção de compra positiva superior a 70%.

Figura 2- Distribuição da frequência das notas correspondentes à escala utilizada para avaliar a intenção de compra nos produtos prontos para o consumo (T0) e durante o período de armazenamento (T90 e T180 dias).



4 CONCLUSÃO

A técnica de coacervação complexa foi adequada para a manutenção da viabilidade da cepa *E. faecium* CRL 183, pois proporcionou uma população de células viáveis superior a 7 log UFC/g durante os 270 dias de armazenamento à temperatura ambiente. No final do período avaliado, a cepa probiótica na forma livre liofilizada também apresentou população de células viáveis superior a 7 log UFC/g, entretanto, verificou-se redução de 3,5 ciclos logarítmicos ao longo do armazenamento, enquanto que para a forma microencapsulada e liofilizada a redução foi de apenas 1,2 ciclos logarítmicos.

Os resultados mostraram claramente que foi possível produzir um chocolate *diet* com adição da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 nas formas livre liofilizada e microencapsulada liofilizada. Os produtos apresentaram elevada viabilidade e estabilidade por 180 dias de armazenamento a 25°C, independentemente da forma do probiótico que foi adicionada. Os chocolates que receberam adição do probiótico na forma livre liofilizada exibiram a melhor aceitação sensorial, principalmente em relação ao atributo textura. Entretanto, os testes de resistência gastrointestinal *in vitro* indicaram que a microencapsulação seguida de liofilização, melhora a resistência da cepa probiótica na fase gástrica.

Os chocolates potencialmente probióticos obtidos apresentam bom potencial para serem introduzidos no mercado, com aceitação e intenção de compra positiva e boa estabilidade durante o período de armazenamento à temperatura ambiente. A cepa na forma microencapsulada e liofilizada se mostrou a mais indicada para garantir a viabilidade do probiótico no chocolate durante a passagem pelo ambiente gastrointestinal. Testes futuros, utilizando modelos *in vivo* serão realizados para confirmação do comportamento da cepa frente ao ambiente gástrico e intestinal e para investigar os efeitos benéficos do microrganismo probiótico na matriz em questão.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS (CNNPA) n° 12 de julho de 1978, Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. *Diário Oficial da União*, 24 jul., 1978.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n° 359 de dezembro de 2003, Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. *Diário Oficial da União*, 26 dez., 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em jul., 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 12 fev. 2015.

BARACAT, M. M. et al. Microcapsule processing in a spotted bed. **Canadian Journal Chemistry Engenieer**, v. 82, p. 1-8, 2004.

BEDANI, R. **Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

BEDANI, R. et al. Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fedon a beef-based animal diet. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1238-1247, 2011.

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

BEGLEY, M. et al. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.

BOSNEA, A. L. et al. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, n. 10, p. 2767-2781, 2014.

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

CARDONA, T. D. et al. Optimizing conditions for heat pump dehydration of lactic acid bacteria. **Drying Technology**, v. 20, n. 8, p. 1611–1632, 2002.

CAVALLINI, D. C. U. et al. Effect of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol- fed rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v. 8, n. 1, p. 1, 2009.

CAVALLINI, D. C. U. et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 126, 2011.

CELIBERTO, L.S.; BEDANI, R.; ROSSI, E.A. CAVALLINI, D.C.U. Probiotics: The Scientific Evidence in the Context of Inflammatory Bowel Disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015. No prelo.

COMAN, M. M. et al. Functional foods as carriers for Synbio®, a probiotic bactéria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 346-352, 2012.

- CORONA-HERNANDEZ, R. I. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 614-628, 2013.
- CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007.
- CHETANA, R. et al. Preparation and properties of probiotic chocolates using yoghurt powder. **Food and Nutrition Sciences**, v.4, n. 3, p. 276-281, 2013.
- DEL PIANO, M. et al. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v.38, p. S248-S255, 2006.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, p. 473-481, 2002.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8 ed. Gaithersburg, AOAC, v. 1, p. 20.01-20.04, 1995.
- 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**, v. 36, n. 3, p. 164-171, 2013.
- FUCHS, R. H. B. et al. “Iogurte” de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.175-181, 2005.
- GOMES, C. R. et al. Influência de diferentes agentes de corpo nas características reológicas e sensoriais de chocolates diet em sacarose e light em calorias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 614-623, 2007.
- GONÇALVES, E. V.; LANNES, S. C. S. Chocolate rheology. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.4, p. 845-851, 2010.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 7, p. 330-347, 2004.
- GLICERINA, V. et al. Rheological, textural and calorimetric modifications of dark chocolate during process. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 1, p. 173–179, 2013.
- GRUNENVALDT, F. L. **Avaliação do desempenho tecnológico e das propriedades físicas e sensoriais de chocolates produzidos com misturas de manteiga de cacau e gorduras low/zero trans**. 2009. 151f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2009.
- HOUGH, G. et al. Number of consumers necessary for sensory acceptability tests. **Food Quality and Preference**, v. 17, n. 2, p. 522–526, 2006.

HUANG, H.-Y. et al. To pre-challenge lactic acid bacteria with simulated gastrointestinal conditions is a suitable approach to studying potential probiotic properties. **Journal of Microbiological Methods**, v.107, p.138-146, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4.ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 2017, 2005.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT – Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

KESTER, J.J. FENNEMA, O.R. Edibles films and coatings: a review. **Food Technology**, v. 10, n. 12, p. 4759, 1986.

KINOUCI, F.L. et al. A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 41444 – 4148, 2012.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KONAR, N. et al. Using polydextrose as a prebiotic substance in milk chocolate: effects of process parameters on physical and rheological properties. **CyTA -Journal of Food**, v. 12, n. 2, p. 150–159, 2014.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003.

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**, v.15, p. 541-550, 2015.

LARENAS, C. J. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 19, p. 111-115, 2002.

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

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolates**. 2001. 195f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

LUCCAS, V.; KIECKBUSCH, T. G. Estudo comparativo do polimorfismo da gordura de cupuaçu e da manteiga de cacau por calorimetria diferencial de varredura (DSC). **Brazilian Journal of Food Technology, Campinas**, v. 9, n. 1, p. 63-68. 2006.

MAILLARD, M.; LANDUYT, A. Chocolate: an ideal carrier for probiotics. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 19, n. 3, p. 13-15, 2008.

MANDAL, S. et al. Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 5, p. 1031-1037, 2012.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p.15–25, 2015.

MARSHALL, B. J.; COOTE, G. G.; SCOTT, W. J. Effects of various gases on the survival of dried bacteria during storage. **Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 206–210, 1973.

MARZOTTO, M. et al. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 857–866, 2006.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3. ed. New York: CRC, 281 p, 1999.

MELLO, F. M. **Chocolate meio amargo contendo substituintes da sacarose e redução do teor de gordura: caracterização sensorial por análise descritiva quantitativa e análise tempo- intensidade**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2005.

MIGUEL, D. P.; ROSSI, E. A. Viabilidade de bactérias ácido lácticas em sorvetes de iogurte durante o período de estocagem. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 93 – 96, 2003.

NEBESNY, E. et al. Properties of sucrose-free chocolates enriched with viable lactic acid bacteria. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3-4, p.358-362, 2005.

NEBESNY, E. et al. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 1, p.33-42, 2007.

NORHAYATI, H. et al. Effect of storage conditions on quality of prebiotic dark chocolate. **Malaysian Journal of Nutrition**, v.19, n. 1, p. 111-119, 2013.

NORHAYATI, H.; MOHD, K. A. Sensory quality of pilot-scale prebiotic chocolates in Malaysia. **Sains Malaysiana**, v.43, n. 9, p.1333–1344, 2014.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida por secagem por *spray drying* e leite de jorro**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, 2006.

OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *Bifidobacterium lactis* (BI 01) and *Lactobacillus acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n.7, p.685–693, 2007.

- PARK, J. H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 146-161, 2005.
- PIĄTEK, J. et al. The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination-*in vitro* study. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.19, n.1, p. 99-102, 2012.
- POSSEMIERS, S. et al. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 97-103, 2010.
- RANADHEERA, R. D. C. S et al. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.
- RIBEIRO, M. C. E. et al. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v.66, p.424–431, 2014.
- RIBOLDI, G. P. et al. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 2009.
- ROSSI, E. A. et al. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, v. 53, n.1, p. 47-51, 2003.
- ROSSI, E. A. et al. Intake of isoflavone- supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* lowers sérum total cholesterol and non- HDL cholesterol of hypercholesterolemic rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 275-282, 2008.
- ROSSINI, K. et al. Changes in the color of white chocolate during storage: potential roles of lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions. **Journal of Food Science Technology**, v. 48, n. 3, p. 305 – 311, 2011.
- SABIKHI, L.; BABU, B.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 586-593, 2010.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 317p.
- SILVA, E. G. P et al. Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 2, p. 159-162, 2006.
- SILVA, P. D. L. et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 452-457, 2015.

SIVIERI, K.; et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 231-237, 2008.

SOLLICH - Instrução de serviço do temperímetro E3 com refrigeração termoelétrica. 17p. 2001.

SUAVE, et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SULTANA, K. et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 338 p, 1993.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS/ NEPA-UNICAMP. Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p

VERCET, A. Browning of white chocolate during storage. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 371-377, 2003.

VISSOTTO, F.Z. et al. Propriedades reológicas de chocolates comerciais tipo cobertura. **Coletânea do ITAL**. Campinas. v. 27, n. 1-2, p. 129-137, 1997.

VISSOTTO, F. Z. et al. Caracterização físico-química e reológica de chocolates comerciais tipo cobertura elaborados com gorduras alternativas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1-2, p. 139-148, 1999.

VISSOTTO, F. Z.; GOMES, C. R.; BATISTA, B. J. L. Caracterização do comportamento reológico e da textura de chocolates sem sacarose. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 107-111, 2005.

ŻYŻELEWICZ, D. et al. Effect of milk chocolate supplementation with lyophilised *Lactobacillus* cells on its attributes. **Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 5, p. 392-406, 2010.

ANEXOS

Anexo 1. Modelo de ficha de avaliação sensorial das formulações.

NOME: _____ DATA: ___/___/___
Amostra: _____

Prove a amostra e indique sua opinião em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, utilizando a escala abaixo:

9 gostei muitíssimo	Aparência: _____
8 gostei muito	Cor: _____
7 gostei moderadamente	Aroma: _____
6 gostei ligeiramente	Sabor: _____
5 nem gostei /nem desgostei	Textura: _____
4 desgostei ligeiramente	Impressão global: _____
3 desgostei moderadamente	
2 desgostei muito	
1 desgostei extremamente	

Assinale abaixo sua intenção de compra:

- Eu certamente compraria o produto
- Eu provavelmente compraria o produto
- Tenho dúvidas se compraria ou não este produto
- Eu provavelmente não compraria o produto
- Eu certamente não compraria o produto

Comentários: _____

Anexo 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____, nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade o desenvolvimento de um chocolate *diet* (sem adição de açúcar) em barra, com adição do microrganismo probiótico *Enterococcus faecium* CRL 183.
2. A minha participação nesse trabalho irá colaborar para o desenvolvimento de um produto funcional (alimento com adição de bactéria láctica benéfica, que contribui para a redução do risco de doenças) que associaria os benefícios do chocolate, (como redução do risco de doenças cardiovasculares e do estresse) e do microrganismo probiótico (como melhora da função intestinal, controle do colesterol e de diarreias e redução do risco de câncer), e seria uma alternativa para a diversificação dos produtos probióticos, oferecendo novas opções para o consumidor.
3. A minha participação como voluntário terá a duração máxima de 30 minutos e deverei informar o quanto gosto ou desgosto do produto, utilizando uma ficha apropriada. As análises serão realizadas uma vez por mês, até que o produto apresente condições adequadas de consumo (Deverei retornar ao laboratório para realização das análises).
4. Ao participar dessa pesquisa serei submetido a riscos mínimos, pois serão utilizadas culturas probióticas, cujas propriedades de saúde e segurança para consumo humano foram extensivamente estudadas. No entanto, alguns componentes do produto, tais como o chocolate e/ ou microrganismo probiótico, podem, eventualmente, causar alguma reação alérgica ou desconforto intestinal em indivíduos que possuem sensibilidade a tais componentes. Nesse caso, poderei me retirar da pesquisa no momento em que observar os primeiros sinais de uma possível alergia.
5. Todas as vezes que houver necessidade de retorno, voltarei à Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP.
6. Não terei despesas de transporte para participar desse estudo, uma vez que as análises serão realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da FCF – Araraquara, em horários de aula e/ ou expediente normal de trabalho. Destacamos que os voluntários serão recrutados entre alunos e funcionários da FCF.
7. Meu nome será mantido em **sigilo**, assegurando assim a minha **privacidade** e se desejar, serei informado sobre os resultados dessa pesquisa pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP.
8. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;
9. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica do projeto pelo telefone (Laboratório de Probióticos: 3301-6932 / Izabela de Souza Correia).
10. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária (o), do estudo “Desenvolvimento e caracterização de chocolate *diet* em barra potencialmente probiótico”.

Araraquara, ___/___/___

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador