



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 014740 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA
FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 5084-5330

Fax: 115084-5334

Email: tinoco@tinoco.com.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE E PRODUTO OBTIDO

Resumo: É descrita a invenção de um processo de obtenção de alimento probiótico à base de chocolate e o produto obtido que compreende um chocolate diet, onde a sacarose é substituída por edulcorantes de alta intensidade e/ou edulcorantes de baixa intensidade, acrescido de microrganismos da cepa probiótica *Enterococcus faecium* nas formas livre liofilizada ou microencapsulada e liofilizada, provendo um produto sem alteração das propriedades sensoriais do produto e com boa estabilidade durante todas as etapas de produção, adequado para ser consumido por indivíduos que apresentam restrição na ingestão de açúcares.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Fabíola de Moraes Spiandorello Bueno

Numero OAB: 244141SP

Numero API:

CPF/CNPJ: 13521027813

Endereço: Rua Faustina Barbosa Stackfleth, 149, Parque Centenário

Cidade: Jundiaí

Estado: SP

CEP: 13214-773

Telefone: (11) 992340347

Fax:

Email: spianfm@terra.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO

CPF: 34863888864

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rodovia Araraquara - Jaú, km 1, Campus Ville

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14801-902

País: BRASIL

Telefone: (11) 339 37904

Fax:

Email: auin@unesp.br

Inventor 2 de 3

Nome: DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

CPF: 25036685857

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rodovia Araraquara - Jaú, km 1, Campus Ville

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14801-902

País: BRASIL

Telefone: (11) 339 37904

Fax:

Email: auin@unesp.br

Inventor 3 de 3

Nome: VALDECIR LUCCAS

CPF: 68674791972

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Av. Brasil, 2880

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13082-793

País: BRASIL

Telefone: (11) 339 37904

Fax:

Email: auin@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	16AUIN010 - CHOCOLATE DIET PROBIOTICO - GRU.pdf
Procuração	PROCURACAO UNESP LEOPOLDO-FABIOLA 2016.pdf
Portaria	DOESP_Nomeacao_Durigan_Marilza.pdf
Relatório Descritivo	16AUIN010 - CHOCOLATE DIET PROBIOTICO - RELATORIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	16AUIN010 - CHOCOLATE DIET PROBIOTICO - REIVINDICACOES.pdf
Desenho	16AUIN010 - CHOCOLATE DIET PROBIOTICO - DESENHOS.pdf
Resumo	16AUIN010 - CHOCOLATE DIET PROBIOTICO - RESUMO.pdf
Documento de Cessão	16AUIN010 - CHOCOLATE DIET PROBIOTICO - TERMOS CESSAO ASSINADOS.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Obrigado por acessar o Peticionamento Eletrônico

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Este pedido foi enviado pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 22/06/2016 às 14:44

001-9		RECIBO DO SACADO			
Local de Pagamento					Vencimento
Pagável em qualquer Banco					Contra-apresentação
Cedente					Agência/Código Cedente
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial					2234-9/333.028-1
Data do Documento	Nº documento	Espécie doc.	Acerte	Data Proces.	Nosso Número
24/02/2016	1601375667	RC	N	24/02/2016	00.000.2.2.16.0137566.7
Uso Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	Valor	(=) Valor Documento
	18/027	RS			RS 70,00
Número: NN Complementar: Petição: Eletrônico.					(-) Desconto/Abatimento
Natureza: 10 - Patente de					(-) Outras deduções
Cod Serviço Petição Vinculada RPI Valor					(+) Mora/Multa
200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT - RS 70,00					(+) Outros Acréscimos
OAB: 235031SP Procurador: Leopoldo Campos Zuanetti					(=) Valor Cobrado
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança					RS 70,00
Sacado					
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO					
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010					
Sacador/Avalista					Autenticação mecânica - Controle Cedente
Corte na linha pontilhada					

001-9		00199.53637 10000.022169 01375.667217 7 00000000007000			
Local de Pagamento					Vencimento
Pagável em qualquer Banco					Contra-apresentação
Cedente					Agência/Código Cedente
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial					2234-9/333.028-1
Data do Documento	Nº documento	Espécie doc.	Acerte	Data Proces.	Nosso Número
24/02/2016	1601375667	RC	N	24/02/2016	00.000.2.2.16.0137566.7
Uso Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	Valor	(=) Valor Documento
	18/027	RS			RS 70,00
Instruções:					(-) Desconto/Abatimento
1. Valores expressos em reais.					(-) Outras deduções
2. Pagamento em cheque, anotar no verso o 'Nosso Número'.					(+) Mora/Multa
3. Pagamento via SIAFI(OB-FATURA): Identificar na 'ob' o 'Nosso Número'.					(+) Outros Acréscimos
4. Vencimento contra apresentação.					(=) Valor Cobrado
OAB: 235031SP Procurador: Leopoldo Campos Zuanetti					RS 70,00
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança					Autenticação mecânica - Ficha de Compensação
Sacado					
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO					
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010					
Sacador/Avalista					
Corte na linha pontilhada					

- GRU ÚNICA: a GRU apresentada ao INPI, como comprovante da retribuição, deve ser única. Não utilize cópias desta GRU para outro pagamento.- PAGAMENTO: o pagamento da GRU deve ser providenciado no PRAZO ADMINISTRATIVO, regulamentado em lei ou Ato Normativo próprio.

DETALHE DO COMPROMISSO

Convênio: 0033-0239-004900019792 **Conta de Débito:** 0239-000130027340

Tipo do Documento: CNPJ **CPF/CNPJ do Fornecedor:**

Nome do Fornecedor: 000009853INPI - INST. NACIONAL

No. compromisso banco: 1022071000100010 **No. compromisso cliente:** 137566/DS1 1011

Tipo de Pagamento: BLQ Outros

Código de Barras: 00199536371000002216901375667217700000000007000

Valor Nominal: 70,00

Desc./Abat.: 0,00 **Juros:** 0,00

Data de Vencimento: 08/03/2016

Data de Pagamento: 08/03/2016

Situação: Efetivado **No. Protocolo:** PGTFORNB08032016900110375

No. Lista de Débito:

Autenticação:

Valor a Pagar: **70,00**

Tipo de Serviço: Pagamento Fornecedor

Complemento do Tipo de Serviço:

Emitir Aviso: Não emitir

Central de Atendimento Santander Empresarial 4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)

SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322

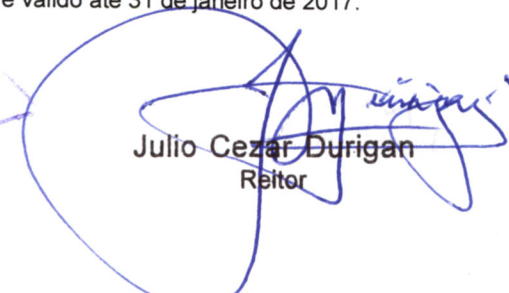
[retornar](#)

[imprimir](#)

PROCURAÇÃO

Por este instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30/01/1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, nº 215, Centro, CEP 01049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ do MF sob o nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente **UNESP**, neste ato representada por seu Magnífico Reitor, de acordo com o Art. 34 de seu Estatuto, Prof. Dr. **JÚLIO CEZAR DURIGAN**, brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 5.872.573-3 SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 833.745.238-20, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **1) LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 235.031; e **2) FABIOLA DE MORAES SPIANDORELLO**, brasileira, advogada, devidamente inscrita na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo, Subseção de Jundiaí sob o número 244.141, ambos lotados junto à Agência UNESP de Inovação, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópia, termos de cessão de direitos, acordos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade industrial, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

Este instrumento é válido até 31 de janeiro de 2017.


Julio Cesar Durigan
Reitor

São Paulo, 7 de janeiro de 2016.

9.º

TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 • 1º ao 6º andar • CEP 01047-000 São Paulo, SP
Telefone: (11) 3258-2611 - Fax: (11) 2174-6858
www.nonocartorio.com.br

Reconheço a 1 firma sem valor econômico por semelhança de **JULIO CEZAR DURIGAN**, do que dou fé.

Em tesº da verdade. **GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO** -
São Paulo Capital, 7 de janeiro de 2016. Valor recebido R\$ 4,80
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba



PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE E PRODUTO OBTIDO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção descreve um alimento probiótico a base de chocolate e o processo de obtenção. Mais especificamente compreende um chocolate *diet* (sem adição de açúcar) com adição de cepa probiótica *Enterococcus faecium* nas formas livre liofilizada ou microencapsulada e liofilizada.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O chocolate é um produto em franca expansão no mercado brasileiro e reconhecido por suas propriedades sensoriais e por seus benefícios à saúde (ABICAB (Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados). Disponível em <<http://www.abicab.org.br/>>). 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 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. *Diário Oficial da União*, 13 nov., 2012).

[003] 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, 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).

[004] Uma das primeiras definições de probióticos foi proposta por Fuller (FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989). Segundo esse pesquisador, probióticos eram definidos como suplementos alimentares à base microrganismos vivos, que agem no trato gastrintestinal, 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, 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.; FAO/WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2001 Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. *Codex Alimentarius Commission*. Recommended international standard for chocolate. Roma, FAO/WHO, 2001.; 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; 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). Segundo a ANVISA, o número mínimo de células viáveis, necessário para que os efeitos benéficos sejam observados situa-se na faixa de 10⁸ a 10⁹ 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 (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., 2008). 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, 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; MENEZES, C. R. *et al.* Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2012).

[005] 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, 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). 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, E. *et al.* Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research and Technology*, v. 225, n.1, p.33-42, 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, M.; LANDUYT, A. Chocolate: an ideal carrier for probiotics. *Agro Food Industry Hi-Tech*, v. 19, n. 3, p. 13-15, 2008.), além de auxiliar na manutenção da viabilidade das cepas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (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.; SABIKHI, L.; BABU, B.; THOMPCKINSON, 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.).

[006] Estudos realizados por pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Probióticos (FCF – UNESP – Araraquara) mostraram que a cepa probiótica *Enterococcus faecium* apresenta efeitos benéficos à saúde, comprovados em estudos *in vitro*, em animais e em estudos clínicos (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 *et al.*, 2009; MIGUEL; ROSSI, 2003; ROSSI *et. al.*, 2003). Os resultados obtidos indicam que a cepa probiótica de *Enterococcus faecium* apresenta capacidade de modulação do perfil lipídico, da microbiota intestinal (BEDANI, 2008; 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) e redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (SIVIERI, K. *et al.* Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically indced colon cancer in male wistar rats. *European Food Research Technology*, v. 228, n. 2, p. 231-237, 2008.) e mama (KINOUCHI, F.L. “logurte” 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). 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.

[007] 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', 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), 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, 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). 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 *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (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., 2008).

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

[009] 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 custobenefício (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).

[010] O chocolate, por ser um alimento utilizado em várias preparações (bolos, biscoitos, pães etc.), com boa aceitação por parte dos consumidores, principalmente por crianças, pode ser considerado um veículo ideal para microrganismos probióticos (NEBESNY, E. *et al.* Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research and Technology*, v. 225, n. 1, p. 33-42, 2007.; 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). 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. 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, 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).

[011] 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. As cápsulas podem apresentar diversas formas e tamanhos, variando de frações de microns a milímetros. A substância interna é denominada de material ativo enquanto que a externa é o agente encapsulante.

[012] 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, 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.; 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.; VILLENA, M. M. J. *et al.* Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, v.50, n.1, p 43-50, 2009). A microencapsulação pode também ajudar a manter a viabilidade dos microrganismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (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). 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, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003.; 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; 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).

[013] Alguns estudos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver chocolates com adição de probióticos microencapsulados ou não. Coman *et al.* (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) 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 10⁷-10⁹ 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 ($p < 0,05$).

[014] Mandal *et al.* (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) 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 10⁸ 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.

[015] 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 10⁸ UFC/g e que o chocolate (amargo e ao leite) melhorou a resistência gastrointestinal dos microrganismos probióticos (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.).

[016] Lalicic'-Petronijevic' et al., (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) 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.

[017] O documento CN104068187 descreve um chocolate contendo probióticos diretamente adicionado, sem micro-encapsulamento.

[018] O documento RS20100201 descreve um chocolate com adição de um microrganismo probiótico adicionado à formulação de chocolate, em temperatura de 49 °C e concentração de 10⁶ células/g chocolate.

[019] O documento US2012015076 descreve uma composição mastigável, baseada em chocolate, a qual é adicionado ingrediente pré ou probiótico encapsulado.

[020] O estado da técnica descreve composições alimentícias à base de chocolate com microrganismos probióticos, ou seja, microrganismos que sobrevivem 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, 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.; MENEZES, C. R. *et al.* Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2012).

[021] No entanto, o estado da técnica não descreve um chocolate *diet* sem açúcar, onde a sacarose é substituída por edulcorantes de alta intensidade e/ou edulcorantes de baixa intensidade, acrescido de microrganismos probióticos, provendo um produto sem alteração das propriedades sensoriais do produto e com boa estabilidade durante todas as etapas de produção, adequado para ser consumido por indivíduos que apresentam restrição na ingestão de açúcares.

SUMÁRIO

[022] A invenção descreve um alimento probiótico à base de chocolate com adição da cepa probiótica *Enterococcus faecium* nas formas livre liofilizada e microencapsulada liofilizada.

[023] A invenção descreve um alimento probiótico à base de chocolate com uma população de células viáveis superior a 7 log UFC/g durante os 270 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

[024] A invenção descreve um alimento probiótico à base de chocolate com boa aceitação sensorial.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[025] A figura 1 apresenta fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas liofilizadas produzidas por coacervação complexa contendo *E. faecium*, sendo (A) (1000x), (B) (3000x) e (C) (5000x).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[026] O processo de obtenção de alimento probiótico à base de chocolate, objeto da presente invenção, compreende em uma primeira etapa na reativação e propagação da cepa probiótica pura de *Enterococcus faecium*.

[027] Em seguida, a cultura probiótica de *E. faecium* é liofilizada, utilizando as técnicas convencionais.

[028] A cultura probiótica de *E. faecium* é microencapsulada pela técnica de coacervação complexa.

[029] 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, C. R. *et al.* Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2012.; SUAVE, et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.; WEINBRECK, F. et al. Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 3550-3555, 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, 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). 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, 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; GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 7, p. 330-347, 2004; 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).

[030] Nesta etapa de microencapsulação da cultura probiótica, é preparada uma solução que atua como material de parede, contendo polímeros de pectina cítrica e caseína bovina, com concentração de sólidos totais 8%, dispersos em água destilada sob agitação mecânica constante, como ajuste do pH para 8,0 usando uma solução de hidróxido de sódio P.A 4,0M. Em seguida, a cepa probiótica *E. faecium* em caldo MRS (108 UFC/ml - unidades formadoras de colônias por mililitro) é adicionada à mistura em condições assépticas.

[031] As microcápsulas obtidas são congeladas a -80 °C e, em seguida, são desidratadas pelo processo de liofilização, por aproximadamente 24 horas.

[032] Na etapa de preparo da formulação de chocolate, os compostos sólidos são homogeneizados para a obtenção de uma pasta uniforme, sendo misturados os edulcorantes de alta intensidade, edulcorantes de baixa densidade, pasta de cacau, líquido de cacau, manteiga de cacau, leite em pó preferentemente desnatado ou integral, à temperatura ambiente, entre 10 a 15 minutos.

[033] Em seguida, a mistura de chocolate segue para refino, com a diminuição do tamanho das partículas, preferentemente entre 20-25 µm

(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.), tendo em vista influenciar os processos reológicos e sensoriais do chocolate (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).

[034] Na conchagem, o produto refinado é submetido à agitação com temperatura controlada durante um longo tempo, para eliminação de compostos voláteis indesejáveis e desenvolvimento de sabores agradáveis (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). 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, S. T. Traditional chocolate making. In: BECKETT, S. T. (Org). *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. London: Black Academic e Professional, p.1-7, 1994; MINIFIE, B. W. Chocolate, cocoa, and confectionery: science and technology. 3 ed. AVI Book published by Van Nostrand Reinhold, 940p. New York, 1985).

[035] Na etapa de 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, K. O. *et al.* Revisão: Temperagem ou Pré-Cristalização do Chocolate. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.7, n.1, p.23-30, 2004).

[036] Na etapa de temperagem, quando a temperatura do chocolate atinge em torno de 28 °C, é adicionado o microrganismo probiótico microencapsulado liofilizado em quantidade suficiente para alcançar 108 UFC/g no produto pronto para o consumo.

[037] Opcionalmente, a cultura probiótica de *E. faecium* é adicionada na formulação de chocolate na forma livre liofilizada em quantidade suficiente para alcançar 108 UFC/g no produto pronto para o consumo.

[038] Nas etapas de moldagem e de resfriamento, 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, K. O. *et al.* Revisão: Temperagem ou Pré-Cristalização do Chocolate. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.7, n.1, p.23-30, 2004).

[039] Em seguida o chocolate é desmoldado e embalado.

TESTES

[040] Foram preparados três diferentes tratamentos para o chocolate: 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).

[041] Os diferentes tratamentos foram submetidos a análises microbiológicas, físicoquímicas e sensoriais, imediatamente após o preparo e durante o período de armazenamento (180 dias).

[042] Análise microbiológica

[043] 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.

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

[045] 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.

[046] Foram consideradas: 1) as recomendações da ANVISA (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., 2008) “para que um alimento seja considerado probiótico deve apresentar de 10⁸ a 10⁹ 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), (Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 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) foi estabelecida como população mínima de microrganismos probióticos 6 log UFC/g.

[047] O acompanhamento da viabilidade dos diferentes tratamentos foi realizado até 270 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

[048] 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 foi observada 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, 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; 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). 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 foi observada 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 foi verificada 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, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003).

[049] **Tabela 1:** 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 °	7,89±0,02 °
------	--	-------------	-------------

[050] Neste teste, 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.

[051] **Caracterização morfológica das microcápsulas com cultura probiótica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

[052] 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.* (PARK, J. H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, v. 10, n. 1, p. 146-161, 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. 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 na presente invenção.

[053] **Propriedades reológicas e granulometria do chocolate**

[054] A Tabela 2 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.

[055] **Tabela 2:** 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 (μ m)*
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	$20,80 \pm 2,86^a$

[056] 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, J.J. FENNEMA, O.R. Edibles films and coatings: a review. *Food Technology*, v. 10, n. 12, p. 4759, 1986.). Resultados similares foram encontrados no estudo de Foong *et al.*, (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.) e Zyżelewicz *et al.* (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) que observaram que a adição do probiótico liofilizado no chocolate também aumentou os valores dos parâmetros reológicos do produto.

[057] **Índice de temperagem (*Temperindex*)**

[058] 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, 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).

[059] 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 subtemperado (Temperíndice inferior a 5,0), adequadamente temperado (Temperíndice igual a 5,0) e sobretemperado (Temperíndice superior a 5,0). Dessa forma, os valores obtidos no presente estudo estão de acordo com o estabelecido para chocolates adequadamente temperados (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; SOLLICH - Instrução de serviço do temperímetro E3 com refrigeração termoelétrica. 17p. 2001).

[060] **Composição centesimal**

[061] A legislação brasileira (Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) nº 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) 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 3 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.

[062] **Tabela 3:** 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/100 g)	544,80±7,62 ^a	539,42±7,09 ^a	537,41±11,27 ^a

[063] **Determinação da atividade de água (Aw)**

[064] A atividade de água das formulações foi avaliada durante todo período de estocagem e os resultados são apresentados na Tabela 4. 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.

[065] Segundo Marshal *et al.* (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), 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.* (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) 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, 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; 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; VERCET, A. Browning of white chocolate during storage. *Food Chemistry*, v. 81, n. 3, p. 371-377, 2003).

[066] **Tabela 4:** Teores médios de atividade de água (A_w) 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}

[067] Segurança microbiológica do chocolate

[068] 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/48 h, aerobiose (FDA, 1995); bactérias do grupo coliformes totais e *E. coli* - placas Petrifilm (3M, Brasil), 37 °C/48 h, (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001); Clostrídios sulfito redutores - ágar Triptose Sulfito-Cicloserina (TSC, Acumedia, EUA), 37 °C/24 h, anaerobiose (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); *Staphylococcus aureus* - ágar Baird Parker (Acumedia, EUA), 37 °C/48 h, 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/24-48 h, 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). Segundo recomendações da ANVISA (Resolução - CNNPA nº 12, de 1978), o chocolate deve possuir no máximo 5x10⁴ UFC/g de bactérias mesófilas totais, 10² UFC/g de coliformes totais, 2x10¹ UFC/g de Clostrídios sulfito redutores, 10³ UFC/g de bolores e leveduras, ausência de *E. coli* em 1 g, ausência de *Staphylococcus aureus* em 0,1 g e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g. Observa-se na Tabela 5 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, à 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, 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).

[069] **Tabela 5:** 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

[070] Determinação da viabilidade celular do microrganismo probiótico (*E. faecium*) no chocolate

[071] A Tabela 6 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 se deve, 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* livre liofilizado) encontrava-se mais concentrado (11 log UFC/g), em comparação ao microencapsulado liofilizado (9 log UFC/g).

[072] **Tabela 6:** Viabilidade celular (log UFC/g) do microrganismo probiótico (*E. faecium*) 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

[073] Atualmente a legislação brasileira recomenda, com base na porção diária do alimento, concentração mínima de células viáveis de 10⁸ a 10⁹ UFC/g (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., 2008). Na presente invenção, o consumo diário de 10 g 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.

[074] Cabe salientar que, na maioria dos trabalhos descritos no estado da técnica, 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* no chocolate, após 180 dias de armazenamento a 25 °C, foi de

100%, confirmando que o produto pode ser armazenado à temperatura ambiente, sem prejuízo de sua funcionalidade.

[075] Avaliação *in vitro* da resistência gastrointestinal da cepa probiótica *E. faecium*

[076] A viabilidade da cepa probiótica *E. faecium*, adicionada ao chocolate e submetida às condições gástricas e entéricas simuladas imediatamente após o preparo, é apresentada na Tabela 7. As células de *E. faecium* na forma livre liofilizada sofreram redução de três ciclos logarítmicos no final da fase gástrica. Por outro 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 gastrointestinal colaborando para que os possíveis efeitos benéficos sejam observados.

[077] **Tabela 7:** 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)
	0 h	8,55±0,09 ^{aA}	7,66±0,05 ^{bA}
Fase Gástrica	2 h	5,60±0,05 ^{aB}	5,57±0,09 ^{aC}

Fase Entérica I	4 h	5,63±0,01 ^{aB}	4,82±0,10 ^{bD}
Fase Entérica II	6 h	5,54±0,02 ^{bB}	5,85±0,03 ^{aB}

[078] **Análise sensorial**

[079] 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, 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). 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 8). 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, 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). 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.

[080] **Tabela 8:** Médias de aceitação de cada atributo avaliado nos diferentes tratamentos ao longo do período de armazenamento a 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}

[081] 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 foi constatada diferença estatística em relação ao chocolate controle (I).

[082] 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 é a adição de flocos de arroz ou castanhas, conferindo ao produto a característica de “chocolate crocante”.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE **caracterizado por** compreender as etapas de:
 - a) liofilização da cepa probiótica pura de *Enterococcus faecium*;
 - b) microencapsulação da cultura probiótica de *E. faecium* pela técnica de coacervação complexa, com material de parede contendo polímeros de pectina cítrica e caseína bovina, com concentração de sólidos totais de 8,0%, dispersos em água destilada sob agitação mecânica constante, como ajuste do pH para 8,0 usando uma solução de hidróxido de sódio P.A 4,0 M, seguido da adição da cepa probiótica de *E. faecium* em caldo MRS de 108 UFC/ml;
 - c) microcápsulas congeladas a -80 °C;
 - d) microcápsulas desidratadas pelo processo de liofilização, por aproximadamente 24 horas;
 - e) preparo da formulação de chocolate utilizando edulcorantes de alta intensidade e/ou edulcorantes de baixa intensidade, com adição do microrganismo probiótico microencapsulado liofilizado em quantidade suficiente para alcançar 108 UFC/g no produto pronto para o consumo quando o chocolate atinge a temperatura em torno de 28 °C, na etapa de temperagem.
2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE **caracterizado por** compreender as etapas de:
 - a) liofilização da cepa probiótica pura de *Enterococcus faecium*;
 - b) preparo da formulação de chocolate utilizando edulcorantes de alta intensidade e/ou edulcorantes de baixa intensidade, com adição do microrganismo livre liofilizado em quantidade suficiente para alcançar 108 UFC/g no produto pronto para o consumo quando o chocolate atinge a temperatura em torno de 28 °C, na etapa de temperagem.
3. PRODUTO OBTIDO de acordo com as reivindicações 1 ou 2,

caracterizado por compreender um chocolate com edulcorantes de alta intensidade e/ou edulcorantes de baixa intensidade com adição da cepa probiótica *Enterococcus faecium* nas formas livre liofilizada ou microencapsulada e liofilizada.

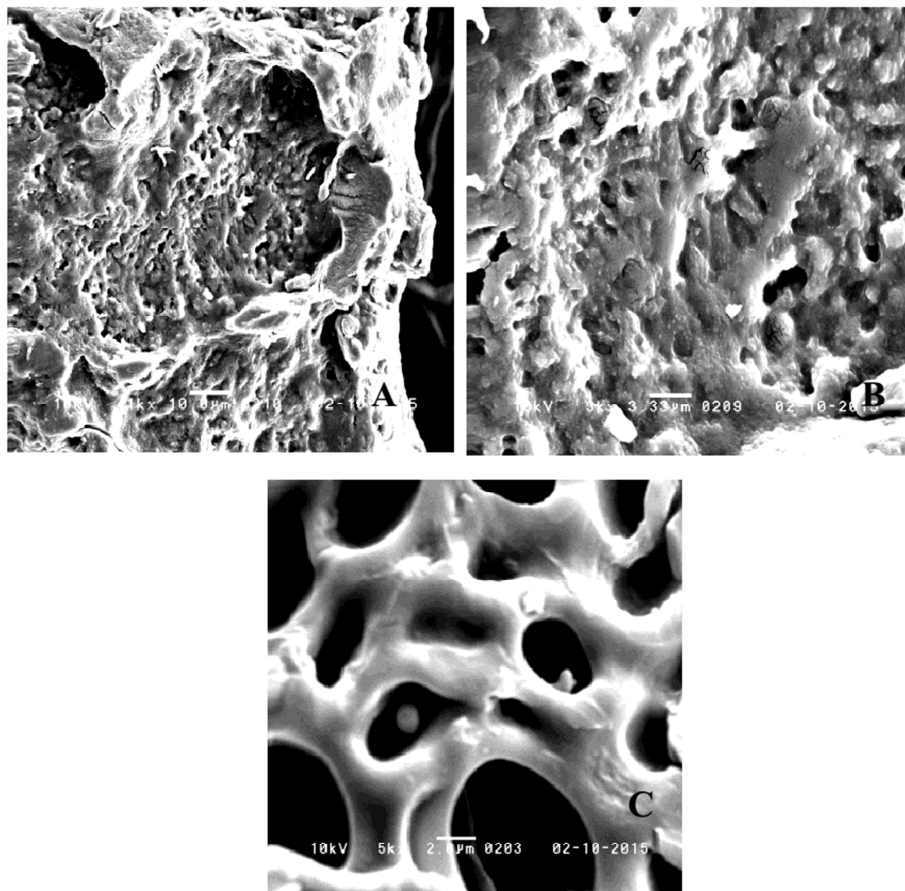


Figura 1

RESUMO

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE E PRODUTO OBTIDO

É descrita a invenção de um processo de obtenção de alimento probiótico à base de chocolate e o produto obtido que compreende um chocolate *diet*, onde a sacarose é substituída por edulcorantes de alta intensidade e/ou edulcorantes de baixa intensidade, acrescido de microrganismos da cepa probiótica *Enterococcus faecium* nas formas livre liofilizada ou microencapsulada e liofilizada, provendo um produto sem alteração das propriedades sensoriais do produto e com boa estabilidade durante todas as etapas de produção, adequado para ser consumido por indivíduos que apresentam restrição na ingestão de açúcares.

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO**, brasileira, casada, estudante, inscrita no CPF/MF sob o nº 348.638.888-64, portadora do documento de identidade RG nº 43.587.174-2, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, Câmpus, CEP 14.801-902; 2. **DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI**, brasileira, casada, professora universitária, inscrita no CPF/MF sob o nº 250.366.858-57, portadora do documento de identidade RG nº 24.902.560-1, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, Câmpus, CEP 14.801-902; 3. **VALDECIR LUCCAS**, brasileiro, casado, pesquisador, inscrito no CPF/MF sob o nº 686.647.919-72, portador do documento de identidade RG nº 4.342.115-8, SSP/SP, residente em Campinas (SP), na Avenida Brasil, nº 2880, Jardim Chapadão, CEP 14.801-902.

Cessionária: **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado "**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE E PRODUTO OBTIDO**" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

Araraquara, 20 de junho de 2016.

Cedentes:

Izabela de Souza Correia Cozentino

IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO

DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

VALDECIR LUCCAS

Cessionária:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

LEOPOLDO C. ZUANETI

Assessor Jurídico
Agência Unesp de Inovação

Testemunhas:

Keyla Santos Bento

1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55

Fabiola de Moraes Spiandorello

2. Fabiola de Moraes Spiandorello
CPF/MF: 135.210.278-13

16AUIN010

Agência UNESP de Inovação
Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, 271 - Bloco II - Barra Funda
CEP 01 140-070, São Paulo - Estado de São Paulo - Brasil
Fone +55 11 3393-7901 / 7903 / 7904 - E-mail: auin@unesp.br

Página 1 de 1

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO**, brasileira, casada, estudante, inscrita no CPF/MF sob o nº 348.638.888-64, portadora do documento de identidade RG nº 43.587.174-2, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, Câmpus, CEP 14.801-902; 2. **DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI**, brasileira, casada, professora universitária, inscrita no CPF/MF sob o nº 250.366.858-57, portadora do documento de identidade RG nº 24.902.560-1, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, Câmpus, CEP 14.801-902; 3. **VALDECIR LUCCAS**, brasileiro, casado, pesquisador, inscrito no CPF/MF sob o nº 686.647.919-72, portador do documento de identidade RG nº 4.342.115-8, SSP/SP, residente em Campinas (SP), na Avenida Brasil, nº 2880, Jardim Chapadão, CEP 14.801-902.

Cessionária: **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado **"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE E PRODUTO OBTIDO"** junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

Araraquara, 20 de junho de 2016.

Cedentes:

IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO

Daniela Cardoso Umbelino Cavallini
DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

VALDECIR LUCCAS

Cessionária:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

LEOPOLDO C. ZUANETI
Assessor Jurídico
Agência Unesp de Inovação

Testemunhas:

Keyla Santos Bento
1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55

Fabíola de Moraes Spiandorello
2. Fabíola de Moraes Spiandorello
CPF/MF: 135.210.278-13

16AUI010

Agência UNESP de Inovação
Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, 271 - Bloco II - Barra Funda
CEP. 01.140-070, São Paulo - Estado de São Paulo - Brasil
Fone: +55 11 3393-7901 / 7903 / 7904 - E-mail: auin@unesp.br

Página 1 de 1

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO**, brasileira, casada, estudante, inscrita no CPF/MF sob o nº 348.638.888-64, portadora do documento de identidade RG nº 43.587.174-2, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, Câmpus, CEP 14.801-902; 2. **DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI**, brasileira, casada, professora universitária, inscrita no CPF/MF sob o nº 250.366.858-57, portadora do documento de identidade RG nº 24.902.560-1, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, Câmpus, CEP 14.801-902; 3. **VALDECIR LUCCAS**, brasileiro, casado, pesquisador, inscrito no CPF/MF sob o nº 686.647.919-72, portador do documento de identidade RG nº 4.342.115-8, SSP/SP, residente em Campinas (SP), na Avenida Brasil, nº 2880, Jardim Chapadão, CEP 14.801-902.

Cessionária: **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado "**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ALIMENTO PROBIÓTICO À BASE DE CHOCOLATE E PRODUTO OBTIDO**" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

Araraquara, 20 de Junho de 2016.

Cedentes:

IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI


VALDECIR LUCCAS

Cessionária:


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

LEOPOLDO C. ZUANETI
Assessor Jurídico
Agência Unesp de Inovação

Testemunhas:


1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55


2. Fabíola de Moraes Spiandorello
CPF/MF: 135.210.278-13