



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Jocelane Zoldan

Avaliação da viabilidade e sobrevivência à passagem gastrointestinal simulada de cepas potencialmente probióticas, bioacessibilidade e análise de antioxidantes em chocolates

Florianópolis
2022

Jocelane Zoldan

Avaliação da viabilidade e sobrevivência à passagem gastrointestinal simulada de cepas potencialmente probióticas, bioacessibilidade e análise de antioxidantes em chocolates

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos, linha de pesquisa: Inovação e Desenvolvimento de Novos Produtos.

Orientador: Professor Juliano De Dea Lindner, Ph.D.
Coorientador: Professor Gilberto Vinícius de Melo Pereira, Ph.D.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zoldan , Jocelane

Avaliação da viabilidade e sobrevivência à passagem gastrointestinal simulada de cepas potencialmente probióticas, bioacessibilidade e análise de antioxidantes em chocolates / Jocelane Zoldan ; orientador, Juliano Dea Lindner , coorientador, Gilberto Vinícius Melo Pereira, 2022.

114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Viabilidade celular.. 3. Simulação gastrointestinal.. 4. Atividade antioxidante. .. 5. Análise sensorial.. I. Dea Lindner , Juliano . II. Melo Pereira, Gilberto Vinícius. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Jocelane Zoldan

Avaliação da viabilidade e sobrevivência à passagem gastrointestinal simulada de cepas potencialmente probióticas, bioacessibilidade e análise de antioxidantes em chocolates

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Yara Maria Franco Moreno, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dão Pedro de Carvalho Neto, Dr.
Instituição Universidade Federal do Paraná

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos, linha de pesquisa: Inovação e Desenvolvimento de Novos Produtos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Juliano De Dea Lindner, Ph.D
Orientador

Florianópolis, 2022.

“Dedico esse trabalho aos meus familiares, em especial ao meu pai Wilson Antônio Zoldan (in memorian), com todo o meu amor”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido viver essa experiência tão rica, de volta a vida acadêmica, pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho nessa jornada e por toda força recebida nos momentos difíceis.

Faço um agradecimento especial ao Professor Juliano Dea Lindner, por ter aceitado me orientar no projeto, e por todo apoio recebido.

Ao colega de laboratório, Ivan De Marco, doutorando, que além de compartilhar comigo seus conhecimentos e me acompanhar durante algumas etapas da maratona de experimentos, se tornou um grande amigo.

A Professora Silvani Verruck, por abrir as portas do seu laboratório e me acolher tão bem para que pudesse deixar mais robustas as análises do meu trabalho, obrigada por toda orientação.

Agradeço também a empresa Nanovetores onde trabalho, em especial a minha chefe Dra. Betina Zanetti, por flexibilizarem meus horários, permitindo que eu pudesse assistir as aulas e também pela contribuição na minha pesquisa realizando a etapa de microencapsulação das cepas, além da doação dos materiais utilizados durante os experimentos.

Faço um agradecimento especial aos meus familiares e amigos pelo apoio e pelas lindas palavras de força nos momentos complicados, as quais me deram incentivo para chegar até aqui. Agradeço especialmente a minha Mãe, a maior inspiração da minha vida e ao meu companheiro Cristyano por todo carinho, paciência e auxílio na formatação do trabalho.

"Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota" **Madre Teresa de Calcutá**

RESUMO

Atualmente existe uma intensa busca pela incorporação de microrganismos probióticos em alimentos. O maior desafio técnico é a adição de cepas probióticas que garantam a viabilidade desejada e sem alterações sensoriais no produto final. O chocolate, um alimento nutricionalmente rico, foi escolhido para este estudo devido à escassez de dados na literatura, bem como, a necessidade de um produto nacional com o apelo probiótico. O objetivo do trabalho foi realizar a microencapsulação das cepas *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Bacillus subtilis* por gelificação iônica, com posterior caracterização por microscopia das microcápsulas e acompanhamento da viabilidade das cepas. Além disso, as cepas na forma livre e microencapsulada foram aplicadas em dois tipos de chocolates comerciais: ao leite e 70% cacau vegano. Foram realizadas análises de viabilidade das cepas por até 90 dias, assim como, a capacidade de resistência das cepas a simulação gastrointestinal (TGI) e capacidade antioxidante durante a passagem pelo TGI. Os chocolates também foram avaliados sensorialmente por 60 provadores não treinados para verificar sua aceitação sensorial. Os resultados demonstraram que a sobrevivência durante os 90 dias é dependente da cepa utilizada, sendo que nesse estudo o *B. subtilis* quando aplicado nas matrizes chocolates, demonstrou melhor desempenho com contagens acima de 8,30 log UFC/g tanto na forma livre como microencapsulada. Já para o *Lcb. Casei*, na forma livre, apresentou diferentes contagens para o chocolates ao leite (6,44 log UFC/g) e chocolate 70% (5,92 log UFC/g). Em relação a análise da simulação ao TGI, as cepas *B. subtilis* e *Lcb. casei* apresentam relevante sobrevivência durante todas as fases da digestão, obtendo na fase intestinal valores acima de 7,9 log UFC/g, fator atribuído à proteção proporcionada pela matriz de chocolate. Na bioacessibilidade, os teores de fenólicos, flavonoides e antioxidantes foram maiores em todas as amostras analisadas após a passagem simulada no TGI, com destaque para as amostras de chocolate 70% cacau que apresentaram as maiores quantificações. As notas obtidas na análise sensorial foram acima de 7,0 na escala hedônica de 9 pontos. Os resultados de aceitação do produto, juntamente com a viabilidade das cepas livres na matriz alimentícia e o alto teor de compostos antioxidantes encontrados neste estudo, indicam o potencial do chocolate probiótico para a diversificação destes produtos no mercado. O somatório de resultados positivos, tanto tecnológicos, como nutricionais, tornam estudos de escala produtiva industrial com transferência da tecnologia para empresas interessadas na inovação uma perspectiva futura.

Palavras-chave: Viabilidade celular. Simulação gastrointestinal. Atividade antioxidante. Análise sensorial.

ABSTRACT

Currently there is an intense search for the incorporation of probiotic microorganisms in foods. The biggest technical challenge is an addition of probiotic strains that guarantee the desired viability and without sensory changes in the final product. Chocolate, a nutritionally rich food, was chosen for this study due to the scarcity of data in the literature, as well as the demand for a national product with probiotic appeal. The objective of this work was to perform out the microencapsulation of *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* strains by ionic gelation, with subsequent microcapsule characterization and monitoring of the viability of the strains. In addition, the free and microencapsulated strains were applied in two types of commercial chocolates: milk and 70% cocoa, lactose-free. Viability analyzes of the strains were carried out for 90 days, as well as the resistance capacity of the strains to gastrointestinal simulation (GIT) and antioxidant capacity during passage through the GIT. The chocolates were also sensorially evaluated by 60 untrained tasters to verify their sensorial acceptance. The results show that survival during the 90 days is dependent on the strain used, and in this study, *B. subtilis*, when applied to chocolate matrices, demonstrated better performance with counts above 8.30 log CFU/g both in free and microencapsulated forms. *Lcb. casei* in free form showed different counts for milk chocolate (6.44 log CFU/g) and 70% chocolate (5.92 log CFU/g). Regarding the analysis of the simulation to GIT, the strains *B. subtilis* and *Lcb. casei* showed good survival during all phases of digestion, obtaining values above 7.9 log CFU/g in the intestinal phase, factor attributed to the protection provided by the chocolate matrix. In terms of bioaccessibility, the levels of phenolics, flavonoids and antioxidants were higher in all samples analyzed after the simulated passage through the GIT, especially in the samples of 70% cocoa chocolate, which presented the highest quantifications. The scores obtained in the sensory analysis were above 7.0 on the 9-point hedonic scale. The results of acceptance of the product, together with the viability of free strains in the food matrix and the high content of antioxidant compounds found in this study, indicate the potential of probiotic chocolate for the diversification of these products in the market. The sum of positive results, both technological and nutritional, make industrial production scale studies with technology transfer to companies interested in innovation a future perspective.

Keywords: Cell viability. Gastrointestinal simulation. Antioxidant activity. Sensory analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Critérios de seleção dos probióticos e suas propriedades.	23
Figura 2- Principais mecanismos de ação dos probióticos.	24
Figura 3 - Exemplos de alimentos probióticos disponíveis no mercado mundial.	34
Figura 4 - Formação da estrutura da molécula durante a gelificação iônica do alginato de sódio.	46
Figura 5- Possível disposição interna do material do núcleo encapsulado em uma partícula de gel de alginato.	46
Figura 6 - Microscopia óptica do <i>Bacillus subtilis</i>	61
Figura 7 - Microscopia óptica do <i>Lacticaseibacillus casei</i>	62
Figura 8 - Microscopia óptica do <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	63
Figura 9 - <i>Bacillus subtilis</i> microencapsulado. Aumentos de 200, 500 e 100 vezes.....	64
Figura 10 – <i>Lacticaseibacillus casei</i> microencapsulado. Aumentos de 200, 500 e 100 vezes.	65
Figura 11- <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> microencapsulado. Aumentos de 200, 500 e 100 vezes.	67
Figura 12– Perfil de preferências dos provadores das amostras de chocolates.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Agentes probióticos definidos pela ANVISA.	27
Tabela 2 - Comparação entre os principais nutrientes dos chocolates: amargo, ao leite e.....	37
Tabela 3- Principais vantagens, desvantagens e aplicações dos métodos de microencapsulação.	48
Tabela 4 - Microrganismos utilizados no projeto.....	50
Tabela 5- Informação nutricional dos chocolates.....	51
Tabela 6- Tratamentos realizados com o <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> referentes a microencapsulação e incorporação na matriz chocolate.....	51
Tabela 7- Tratamentos realizados com o <i>Lacticaseibacillus casei</i> referentes a.....	52
Tabela 8- Tratamentos realizados com o <i>Bacillus subtilis</i> referentes a microencapsulação	52
Tabela 9 – Descrição da composição dos fluídos utilizados nas análises gastro-intestinais...	56
Tabela 10 - Viabilidade em log UFC/g dos microrganismos livres e microencapsulados em temperatura ambiente (23 °C) e refrigerada (5 °C) durante o <i>shelf life</i> de 90 dias.	68
Tabela 11- Valores para atividade de água (aw) das amostras de chocolate estocadas a temperatura ambiente por 90 dias.....	71
Tabela 12- Valores de pH das amostras de chocolate acondicionadas temperatura ambiente por 90 dias.....	72
Tabela 13– Viabilidade celular das cepas potencialmente probióticas aplicadas em chocolate na forma livre e microencapsulada durante 90 dias de <i>shelf life</i> a 23 °C.....	73
Tabela 14 - Viabilidade em log UFC/g dos microrganismos livres e microencapsulados em base chocolate na simulação de passagem pelo trato-gastrointestinal (TGI).	75
Tabela 15- Teor de fenólicos total (TFT) das amostras de chocolate nas etapas da simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média ± desvio padrão) expressos em equivalente de ácido gálico (mg/g).	78
Tabela 16 - Quantificação de flavonoides totais das amostras de chocolate nas etapas da simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média ± desvio padrão) expressos em mg equivalente de catequina por grama de chocolate (mg EC g ⁻¹ chocolate).....	80
Tabela 17- Determinação da capacidade sequestradora do radical DPPH• das amostras de chocolate durante a simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média ± desvio padrão) expressos em µmol TEAC/g.	82

Tabela 18 - Determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS•+ das amostras de chocolate durante a simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média ± desvio padrão) expressos em µmol equivalente de Trolox.....	83
Tabela 19 - Determinação do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) das amostras de chocolate durante a simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média ± desvio padrão) expressos em µmol equivalente de Trolox.....	85
Tabela 20 - Análise sensorial das amostras de chocolate médias, atributos avaliados nas amostras de chocolates. As notas foram dadas utilizando a escala hedônica de 9 pontos.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A/O – Emulsão água em óleo
- ABICAB – Associação Brasileira da Indústria do Cacau, Amendoim e Balas
- ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ – Cloreto de alumínio
- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BAL – Bactérias ácido lácticas
- BHA – Hidroxianisol de butila
- BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio (Biochemical Oxygen Demand)
- CO_2 – Dióxido de carbono
- DP – Desvio padrão
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- FDA – Food and Drug Administration
- FRAP – Potencial Antioxidante Redutor Férrico
- GRAS – Geralmente considerada segura (Generally Recognized As Safe)
- HCl – Ácido clorídrico
- HDL – High Density Lipoprotein
- ITU – Infecções do trato urinário
- $K_2S_2O_8$ – Persulfato de potássio
- LDL – Low Density Lipoprotein
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MRS – de Man Rogosa Sharpe
- $NaNO_2$ – Nitrito de sódio
- NaOH – Hidróxido de sódio
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- QPS – Status de Presunção de Segurança Qualificada
- Rpm – Rotação por minuto
- SAS – Statistic Analysis Software
- SGF – Digestão gástrica
- SIF – Digestão intestinal
- SSF – Digestão oral
- TFT – Teor de Fenólicos Totais

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UV-VIS – Ultravioleta Visível

β -CD – β -ciclodextrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	21
2.1.1	Definição	21
2.1.2	Mecanismos de ação	22
2.1.3	Características.....	26
2.1.3.1	<i>Gênero Lactobacillus.....</i>	27
2.1.3.2	<i>Gênero Bacillus</i>	29
2.1.4	Efeitos benéficos dos probióticos e estudos clínicos.....	30
2.2	MERCADO E DESAFIOS ENVOLVENDO O USO DE PROBIÓTICOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	32
2.3	CHOCOLATE	35
2.3.1	Compostos fenólicos	38
2.4	DESAFIOS NA PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO PROBIÓTICO.....	40
2.5	MICROENCAPSULAÇÃO	41
2.5.1	Métodos.....	43
2.5.1.1	<i>Coacervação simples</i>	43
2.5.1.2	<i>Evaporação/emulsão do solvente</i>	43
2.5.1.3	<i>Spray-drying</i>	44
2.5.1.4	<i>Spray-chilling</i>	44
2.5.1.5	<i>Gelificação iônica.....</i>	44
2.5.1.6	<i>Leito fluidizado</i>	46
2.5.1.7	<i>Extrusão.....</i>	47

2.5.2	Agentes encapsulantes	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	MATERIAIS.....	50
3.2	TRATAMENTOS.....	51
3.3	MÉTODOS	52
3.3.1	Preparo dos inóculos microbianos	52
3.3.2	Enumeração dos microrganismos	53
3.3.3	Microencapsulação	53
3.3.4	Caracterização morfológica por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
3.3.5	Avaliação da sobrevivência dos microrganismos aos processos de encapsulação	54
3.3.6	Viabilidade das cepas durante o armazenamento	54
3.3.7	Aplicação das cepas nos chocolates.....	54
3.3.8	Atividade de água e pH das amostras de chocolate.....	54
3.3.9	Viabilidade das cepas em amostras de chocolate durante o armazenamento.....	55
3.3.10	Sobrevivência das cepas na forma livre e microencapsulada na matriz chocolate, durante a simulação gastrointestinal in vitro	55
3.3.11	Análise dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante das amostras de chocolate contendo as cepas potencialmente probióticas livres e encapsuladas.....	56
3.3.11.1	<i>Obtenção dos extratos/amostras</i>	<i>56</i>
3.3.11.2	<i>Determinação da capacidade de redução de Folin-Ciocalteu das amostras de chocolate.....</i>	<i>56</i>
3.3.11.3	<i>Quantificação de flavonoides totais das amostras de chocolate.....</i>	<i>57</i>
3.3.11.4	<i>Capacidade sequestradora do radical DPPH das amostras de chocolate</i>	<i>57</i>
3.3.11.5	<i>Capacidade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS das amostras de chocolate.....</i>	<i>58</i>
3.3.11.6	<i>Potencial antioxidante redutor férrico FRAP das amostras de chocolate.....</i>	<i>58</i>
3.3.12	Análise sensorial das amostras de chocolate	58

3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DOS MICRORGANISMOS AO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO	60
4.2	ARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS PROBIÓTICAS	61
4.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS LIVRES E ENCAPSULADOS DURANTE A ESTOCAGEM.....	68
4.4	ATIVIDADE DE ÁGUA (AW) E PH DOS CHOCOLATES PROBIOTICOS DURANTE A ESTOCAGEM.....	70
4.5	IABILIDADE DOS PROBIOTICOS APLICADOS NAS DIFERENTES MATRIZES DE CHOCOLATE DURANTE A ESTOCAGEM	72
4.6	AVALIAÇÃO DA RESISTENCIA DOS MICROORGANISMOS APLICADOS EM CHOCOLATE DURANTE A SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL.....	75
4.7	ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATE CONTENDO AS CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS LIVRES E ENCAPSULADAS.....	77
4.7.1	Determinação do teor de fenólicos totais	77
4.7.2	Quantificação de flavonoides totais.....	79
4.7.3	Capacidade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)....	81
4.7.4	Capacidade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS	83
4.7.5	Potencial antioxidante redutor férrico FRAP	84
4.8	ANÁLISE SENSORIAL DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATE.....	86
5	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92
	ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	107
	ANEXO B – Questionário de Consumo.....	111
	ANEXO C – Relatório de Ensaio	112

1 INTRODUÇÃO

Atualmente alimentos que promovem saúde e/ou ajudam a melhorar o estado nutricional geral do consumidor, têm se tornando cada vez mais atraentes no mercado mundial, devido à conscientização dos consumidores em relação à importância da escolha dos alimentos (BINDA *et al.*, 2020). Sendo assim, alimentos probióticos, bem como prebióticos e simbióticos, ganham destaque considerando seus potenciais funcionais (MIRANDA *et al.*, 2021; SILVEIRA, 2018).

O consumo de alimentos probióticos é impulsionado por efeitos à saúde e promoção do bem-estar (BINDA *et al.*, 2020). Probióticos apresentam características específicas, como: estimular a multiplicação de bactérias benéficas, reforçar os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (FREIRE *et al.*, 2021; NUNES; GARRIDO, 2019), além de auxiliar na barreira protetora com a produção de compostos que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos (FAO/WHO, 2001). Estes compostos produzidos incluem vitaminas do complexo B, as quais apresentam importância na proteção do fígado. Outras propriedades dos probióticos incluem a influência no trânsito intestinal, ajuda na absorção de nutrientes, aumento do valor nutritivo de alimentos e redução na acidez durante armazenamento do produto final (FREIRE *et al.*, 2021; NUNES; GARRIDO, 2019).

O termo probiótico pode ser definido como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014). De acordo com a Resolução RDC nº 241 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – (BRASIL, 2018), probióticos são “microrganismos vivos capazes de melhorar a microbiota intestinal trazendo benefícios à saúde do indivíduo”. Entre os principais benefícios desses microrganismos destacam-se a potencial manutenção saudável da microbiota saudável (MARTÍN *et al.*, 2015).

Para que os probióticos possam sobreviver durante o processamento, estocagem e processo digestivo existem diversas técnicas atualmente aceitas, sendo a microencapsulação uma delas, a qual protege os microrganismos de condições adversas do meio, e em alguns casos essa tecnologia permite a liberação do microrganismo em condições específicas (ARSLAN-TONTUL; ERBAS, 2017; VIANA *et al.*, 2021; ZHANG; LOU; SCHUTYSER, 2018). Além disso, a microencapsulação de probióticos é considerada uma abordagem eficaz para a sobrevivência destes sob condições gastrointestinais e melhora a viabilidade durante o *shelf life* (HUQ *et al.*, 2017).

Nos exemplos de alimentos probióticos disponíveis no mercado mundial destacam-se os pioneiros produtos lácteos. No entanto, outros produtos vêm conquistando espaço, como é o caso dos sucos de frutas, barras de cereais e creme de avelã (SILVA *et al.*, 2017). Uma tendência de mercado é conciliar os efeitos benéficos dos compostos fenólicos presentes em alguns alimentos com os probióticos.

Seguindo esta tendência, o chocolate pode ser uma ótima alternativa para amplificar a variedade e o acesso desses produtos funcionais ao consumidor (HOSSAIN *et al.*, 2020). Entre as principais propriedades benéficas do chocolate está a sua reconhecida capacidade antioxidante proveniente da presença de compostos fenólicos do cacau. Os compostos fenólicos desempenham papel importante em retardar o processo oxidativo na matriz de suporte dos probióticos, o que é uma das principais causas do declínio da população desses microrganismos em alimentos (TOKER *et al.*, 2017). Estudos feitos com o chocolate ao leite e amargo armazenados a temperaturas de refrigeração verificaram seu potencial como matriz alimentar (KOBUS-CISOWSKA *et al.*, 2019; KONAR *et al.*, 2016; TOKER *et al.*, 2017). No entanto, são escassos trabalhos de verificação de viabilidade dos probióticos armazenados em temperatura ambiente, que seria a condição ideal para que essa matriz possa ser mais facilmente comercializada. São escassos também, estudos de seleção de espécies microbianas potencialmente probióticas que possam ser utilizadas na matriz chocolate mantendo sua viabilidade.

Atualmente existe uma intensa busca pela incorporação destes microrganismos em alimentos que fazem parte da dieta. O maior desafio técnico é a adição da cepa probiótica mantendo a sua viabilidade e sem alterações sensoriais no produto final. O chocolate, um alimento nutricionalmente rico, foi escolhido para este estudo, devido à escassez de dados no estado da arte e por não haver um produto nacional com este apelo. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a viabilidade das cepas potencialmente probióticas de *Lacticaseibacillus casei* e *Lactiplantibacillus plantarum* e *Bacillus subtilis* na forma livre e microencapsulada aplicadas em dois tipos de chocolates comerciais: ao leite e 70% cacau, vegano. Além disso, a resistência a passagem gastrointestinal, o teor de fenólicos, de flavonóides totais e atividade antioxidante durante a simulação gastrointestinal, bem como a aceitação do consumidor foram avaliadas.

Neste estudo foram avaliadas três diferentes cepas probióticas *Lacticaseibacillus casei* e *Lactiplantibacillus plantarum*, pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), e *Bacillus subtilis*, sendo aplicadas na forma livre e microencapsulada em dois tipos de chocolates comerciais: ao leite e 70% cacau, vegano. O estudo aplicando *B. subtilis* em matriz chocolate

é inédito no estado da arte. O escopo do trabalho foi verificar a viabilidade das cepas probióticas durante o *shelf life*, avaliar também a resistência na passagem gastrointestinal das cepas que apresentaram os melhores resultados de viabilidade. Avaliou-se também o teor de fenólicos totais, de flavonóides totais e atividade antioxidante durante a simulação gastrointestinal das amostras de chocolate. Por fim foi realizada a análise sensorial com os produtos de melhores resultados do estudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade das cepas potencialmente probióticas de *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Bacillus subtilis* livres e microencapsulados aplicados em chocolates comerciais: ao leite e 70% cacau, vegano, durante o *shelf life*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Microencapsular por geleificação iônica as cepas de *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Bacillus subtilis*;
- b) Caracterizar as micropartículas formadas quanto a morfologia e tamanho;
- c) Estudar a viabilidade dos microrganismos microencapsulados durante 90 dias em temperatura ambiente;
- d) Incorporar em chocolate convencional ao leite e 70% cacau, vegano as cepas potencialmente probióticas livres e microencapsuladas em etapa de temperagem do processamento do chocolate;
- e) Estudar a viabilidade dos probióticos aplicados nas matrizes chocolates na forma livre e microencapsulada durante *shelf life* de 90 dias em temperatura ambiente;
- f) Analisar a resistência dos microrganismos livres e microencapsulados aplicados ao chocolate em soluções simulantes de diluções gástrico e intestinal;
- g) Avaliar flavonoides totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante dos chocolates pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP durante passagem gastrointestinal simulada;
- h) Analisar sensorialmente as amostras de chocolates potencialmente probióticos

que apresentaram melhor viabilidade em *shelf life* e melhor resistência a simulação gastrointestinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

2.1.1 Definição

Bactérias probióticas têm sido definidas de diferentes formas ao longo do tempo. Este termo tem origem grega e significa “para vida”. Foi primeiramente definido como “compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano” (CHEN; WALKER, 2005). O termo “probiótico” foi pela primeira vez usado em 1965 para designar microrganismos que exerciam efeitos benéficos para a saúde ao melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (RAUD, 2008). Fuller (1989) definiu probióticos como “suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal e melhorando suas funções fisiológicas” (CHEN; WALKER, 2005).

Na década de 90, foi apresentada uma definição mais específica, a qual segue sendo utilizada atualmente, onde probióticos são “microrganismos viáveis, incluindo bactérias lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado, que exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro, após ingestão, devido à melhoria das propriedades da microflora nativa” (GOMES; MALCATA, 1999). Todas as definições concordam em um ponto principal: probióticos devem conferir algum tipo de benefício à saúde do hospedeiro.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são “microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, são capazes de promover benefícios ao hospedeiro a partir da supressão de patógenos endógenos e exógenos, beneficiando a resposta imune” (MIRANDA *et al.*, 2021). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que a quantidade mínima viável deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidade formadoras de colônia por ingestão (UFC/ ingestão), na recomendação diária do produto pronto para consumo, sendo que, valores menores podem ser aceitos se for comprovada sua eficácia.

Atualmente, os probióticos têm sido amplamente estudados e propagados, com fácil aceitação na alimentação para auxiliar na regulação do microbioma intestinal (DOMINGO, 2017). Estes são um dos principais vetores para promover a ação de diferentes microrganismos endógenos humanos, visando sempre a saúde do hospedeiro (ZHU *et al.*, 2015) e em alguns casos podem também ser usados no tratamento adjuvante de algumas doenças. O histórico de utilização, bem como sua regulamentação e seus ganhos sistêmicos, encoraja o uso dessa terapia

para diversas doenças associadas ou causadas por bactérias (CAMBIAGHI *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2021).

Os probióticos apresentam inúmeras vantagens em relação à saúde humana. Sendo sua principal o efeito sobre o desenvolvimento da microbiota que habita o organismo, garantindo um equilíbrio adequado entre os patogênicos e as bactérias para a função normal do organismo (homeostase). Estudos moleculares e genéticos tornaram possível determinar os efeitos benéficos dos probióticos e dividir seus mecanismos de ação em quatro categorias, sendo estas: antagonismo através da produção de substâncias antimicrobianas; competição com patogênicos pela adesão ao epitélio e por nutrientes; imunomodulação do hospedeiro; e inibição da produção de toxinas bacterianas (KIOUSI *et al.*, 2019).

Os principais microrganismos probióticos aplicados em alimentos são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SAAD, 2006). Contudo, o gênero *Lactobacillus* é predominante na lista de probióticos aprovados, além disso, representando um papel multifuncional para a produção de alimentos, como culturas *starter* de produtos lácteos e probióticos (SILVA, 2016).

2.1.2 Mecanismos de ação

O mecanismo de ação dos probióticos não está totalmente estabelecido. Para que o probiótico promova seu benefício, este deve estar viável quando consumido, permanecer vivo após contato com o suco gástrico e a bile, aderir-se à mucosa intestinal e competir com microrganismos patogênicos, promovendo sua ação satisfatória na modulação de inflamação e imunidade (MARQUES *et al.*, 2020; MORAIS; JACOB, 2006; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

Como citado anteriormente, os probióticos podem ser divididos em quatro categorias de acordo com os mecanismos de ação, sendo: 1. Antagonismo através da produção de substâncias antimicrobianas; 2. Competição com patogênicos pela adesão ao epitélio e por nutrientes; 3. Imunomodulação do hospedeiro; 4. Inibição da produção de toxinas bacterianas (KIOUSI *et al.*, 2019).

Explicando de maneira detalhada, podemos dizer que os dois primeiros mecanismos citados estão diretamente relacionados ao efeito em outros microrganismos. São importantes na profilaxia, no tratamento de infecções e na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro. A capacidade das estirpes probióticas se associarem, pode conduzir à formação de

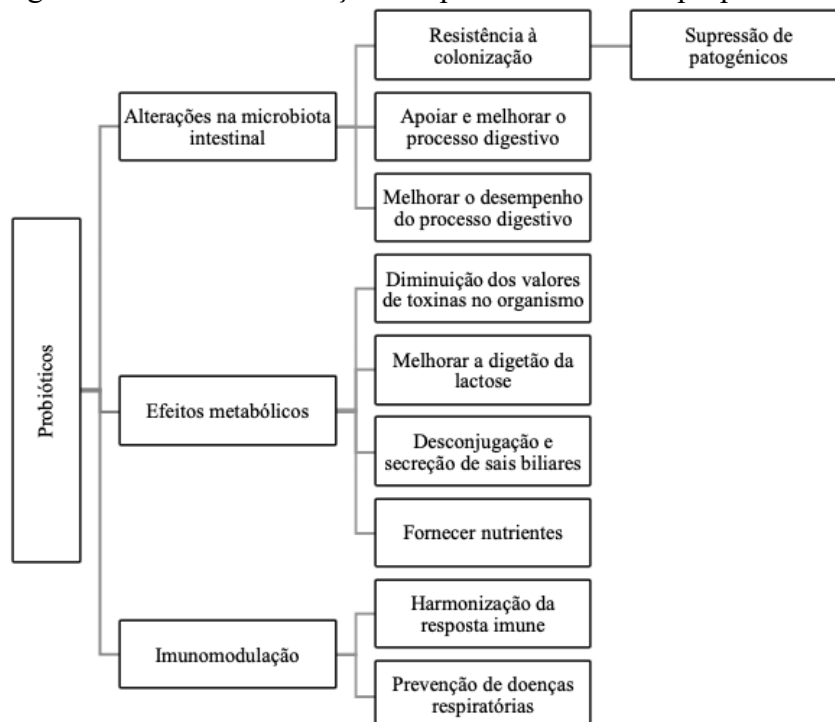
uma barreira protetora impedindo assim a colonização de bactérias patogênicas no epitélio (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2017).

As bactérias probióticas podem manifestar capacidades de adesão às células epiteliais bloqueando patógenos. Este mecanismo exerce importante efeito sobre a condição de saúde do hospedeiro. Além do mais, a adesão dos probióticos às células epiteliais pode desencadear uma cascata de sinalização, levando à modulação imunológica. Alternativamente, a liberação de alguns componentes solúveis, pode causar uma ativação direta ou indireta (através de células epiteliais) de células imunológicas. Esse efeito desempenha um papel importante na prevenção e tratamento de doenças contagiosas, bem como na inflamação crônica do trato gastrointestinal ou da pele (KIOUSI *et al.*, 2019).

O terceiro mecanismo de ação; o efeito imunomodulador da microbiota intestinal, baseia-se em três fenômenos aparentemente contraditórios (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2017): 1. Indicação e manutenção do estado de tolerância imunológica a antígenos ambientais (nutricionais e inalatórios); 2. Indução e controle de reações imunológicas contra patógenos de origem bacteriana e viral; 3. Inibição de reações autoagressivas e alérgicas.

A Figura 1 esquematiza os mecanismos de ação dos probióticos e os seus efeitos

Figura 1- Critérios de seleção dos probióticos e suas propriedades.

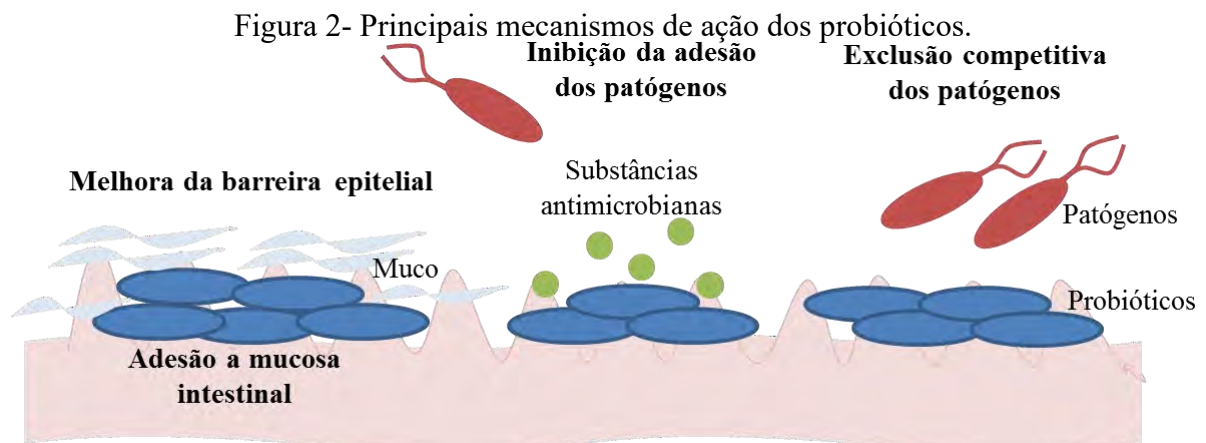


Fonte: MARKOWIAK & SLIZEWSKA, (2017).

Os probióticos apresentam a capacidade de melhorar a barreira epitelial promovendo a secreção de muco. Além disso, algumas cepas probióticas liberam peptídeos ativos, conhecidos como bacteriocinas, que agem contra bactérias, fungos e vírus, e apresentam a capacidade de estabilizar a barreira intestinal. Outras substâncias antimicrobianas também são produzidas pelos probióticos, como os ácidos lático e acético que apresentam efeito inibitório em bactérias Gram-negativas. Dessa forma, os probióticos atuam de diversas maneiras interferindo na adesão dos patógenos na mucosa intestinal (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2020; SILVA, 2016).

As bactérias probióticas ocupam locais de adesão na mucosa intestinal formando uma espécie de barreira física que impede a ligação das bactérias patogênicas. Assim, estas bactérias não conseguem se ligar a estes receptores e conseqüentemente são excluídas pela competição (MONTEIRO, 2012; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008). E a escassez de nutrientes disponíveis para as bactérias patogênicas é um fator limitante de colonização. No intestino, os microrganismos probióticos se nutrem de ingredientes que foram parcialmente degradados pelas enzimas digestivas ou que foram intencionalmente adicionados à dieta, tornando-os indisponíveis aos patógenos, e por conseqüência, impedindo a proliferação (THEOPHILO; GUIMARÃES, 2008).

Outro mecanismo de ação dos probióticos é a produção de ácidos orgânicos como o propiônico, o acético, o butírico e o lático, além do peróxido de hidrogênio, que reduzem o pH intestinal, e retardam o crescimento de bactérias patogênicas sensíveis a estes compostos (MONTEIRO, 2012; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008). Os probióticos também tem demonstrado papel na síntese de vitaminas K, B1, B2, B6, ácidos pantotênico e nicotínico (MONTEIRO, 2012). Estes principais mecanismos de ação dos probióticos estão apresentados na Figura 2.



Fonte: DA SILVA, 2016.

Alguns estudos ainda sugerem que os probióticos podem estimular o sistema imune. Acredita-se que estes efeitos sejam mediados pela ativação de macrófagos, proliferação de células T, produção de anticorpos e produção de *interferon*, entre outros. Ressaltando ainda, que estes efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (MONTEIRO, 2012; THEOPHILO; GUIMARÃES, 2008).

Lactobacillus e *Bifidobacterium* são capazes de promover lise de proteínas com potencial alergênico no trato gastrintestinal. Este processo pode contribuir para a redução da alergenicidade das proteínas, minimizando o risco de alergia alimentar (MORAIS; JACOB, 2006; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011). Algumas cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sintetizam lactato e ácidos graxos como produto final da fermentação de carboidratos. Estes aderem aos enterócitos quem possuem ação protetora dos velos e das superfícies absortivas contra toxinas produzidas por patógenos, acarretando em regeneração da mucosa. Assim os probiótico auxiliam na manutenção da superfície absortiva de nutrientes (KIOUSI *et al.*, 2019).

Alguns *Lactobacillus* têm a capacidade de estimular secreção de mucina pelas células intestinais e espessar a barreira intestinal contribuindo para uma diminuição de processos alérgicos e cancerígenos, que podem ocorrer pelo contato de macromoléculas no sangue, protegendo também contra infecção (MACK, 2003; MARQUES *et al.*, 2020; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011). Alguns estudos já demonstraram que a administração de *Lacticaseibacillus casei* está relacionada com a indução de uma resposta antitumoral mediada por células T e a ativação de macrófagos, assim como a supressão da formação de tumores de cólon em camundongos (KATO; ENDO; YOKOKURA, 1994) e a inibição de metástases pulmonares (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004; MATSUZAKI; SHIMIZU; YOKOKURA, 1990).

A ingestão de *Lactobacillus* pode melhorar a resistência inespecífica do hospedeiro à microrganismos patogênicos, facilitando desta maneira a exclusão destes no intestino. Estudos mostram que a administração de *Lcb. casei* e *Lactobacillus bulgaricus* ativa a produção de macrófagos. A ingestão de *Lcb. casei* e *Lactobacillus acidophilus* induz a fagocitose. A fagocitose é responsável pela ativação precoce da resposta inflamatória, mesmo antes da produção de anticorpos. Os fagócitos liberam agentes tóxicos, como espécies reativas de oxigênio e enzimas líticas, em várias reações inflamatórias (COSTA; VARAVALLLO, 2011; KWON *et al.*, 2010).

Já em relação ao *Bacillus*, algumas espécies e seus esporos já foram bastante caracterizados quanto ao seu potencial probiótico. A maioria dos estudos se concentrou em

Bacillus subtilis, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus licheniformis*. É aceito que *Bacillus* podem estimular a imunidade inata, excluir competitivamente patógenos potencialmente nocivos, secretar antimicrobianos e ter o potencial de produzir nutrientes benéficos (ALMADA, 2017; CUTTING, 2011). Os esporos são metabolicamente inativos e altamente resistentes a condições adversas, como altas temperaturas, radiação ionizante, abrasão mecânica, solventes químicos, detergentes, enzimas hidrolíticas, dessecação, pH extremo e antibióticos. As principais vantagens do esporo como probiótico são: estes podem ser armazenados à temperatura ambiente em condições secas em forma dessecada sem qualquer efeito deletério sobre a viabilidade, sobrevivem enquanto se movem através de um meio ácido, como o pH do estômago (ALMADA, 2017; ALVES *et al.*, 2018; KOBUS-CISOWSKA *et al.*, 2019).

2.1.3 Características

Uma cepa bacteriana é considerada probiótica apenas quando preenche alguns critérios: exigências fisiológicas e de produção através dos quais as cepas bacterianas devem sobreviver e apresentar-se em condições de realizar suas funções benéficas ao hospedeiro, como diz sua definição. Além disso, a cepa deve ser avaliada não apenas em relação às suas características benéficas, mas também em relação aos seus aspectos como segurança e funcionalidade (DOMINGO, 2017; HILL *et al.*, 2014; KIOUSI *et al.*, 2019).

O microrganismo probiótico deve ser de origem humana, apresentar ausência de patogenicidade e resistência à antibióticos. Em relação à funcionalidade, deve apresentar estabilidade frente ao meio ácido e à bile, capacidade de aderir à mucosa intestinal e capacidade de colonizar, mesmo que temporariamente, o trato gastrointestinal humano, capacidade de produzir compostos antimicrobianos, além de ser metabolicamente ativo no intestino (BINDA *et al.*, 2020; FIJAN, 2014)

Ao considerar a sua aplicação em produtos, a cepa probiótica deve também possuir fácil adaptação aos diferentes tipos de estresses que venha a sofrer durante processamentos e produzir características sensoriais de aroma, sabor e textura, caso o produto final passe por processo fermentativo. Sua viabilidade durante todo *shelflife* alegado na embalagem do produto que a contém é um fator de extrema importância (PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; SILVA *et al.*, 2017).

A Tabela 1 apresenta as espécies de microrganismos atualmente consideradas probióticas no Brasil, no entanto, esta lista está em constante atualização.

Tabela 1- Agentes probióticos definidos pela ANVISA.
Agentes probióticos

<i>Bacillus clausii</i>
<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>

Fonte: Autora (2022)

2.1.3.1 Gênero *Lactobacillus*

Essas bactérias foram isoladas pela primeira vez a partir de fezes de neonatos alimentados com leite materno. Estes microrganismos são Gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, apresentam forma bacilar ou cocobacilar e são aerotolerantes ou anaeróbios (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

As bactérias deste gênero, pertencentes a um amplo grupo conhecidas como bactérias ácido lácticas (BAL), são microrganismos catalase-negativos, desprovidos de citocromos, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos. Mesófilas ou termófilas, com temperatura ótima para crescimento, entre 30 °C a 37 °C e entre 42 °C a 50 °C, respectivamente, além do fato de a maioria ser inativada a temperaturas superiores a 70 °C. O ácido láctico é o principal produto final da fermentação de açúcares (FREIRE *et al.*, 2021).

As espécies de *Lactobacillus* são largamente distribuídas na natureza e algumas delas são conhecidas pela importância na indústria alimentícia e, como agentes probióticos, agem de forma benéfica em seres humanos e animais (MATIAS *et al.*, 2016). O maior foco de mercado é a adição deste microrganismo em derivados de leite fermentados, sendo que a escolha depende de uma série de fatores (SILVA, 2016).

Os *Lactobacillus* são amplamente utilizados em preparações probióticas devido as qualidades de resistência em meios ácidos e sais de bile, atividade antimicrobiana, e sobrevivência durante a passagem gastrointestinal (FREIRE *et al.*, 2021; REN *et al.*, 2013).

Até março de 2020, o gênero *Lactobacillus*, que foi proposto em 1901 por Beijerinck, contava com 261 espécies que diferenciavam muito entre si em aspectos genotípicos, fenotípicos e ecológicos. Por isso, para manter agrupadas espécies que tenham mais afinidade entre si, Zheng *et al.* (2020), propôs uma nova organização taxonômica dessas espécies, “*A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae*”. O gênero *Lactobacillus* era classificada no filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae*, que continha os gêneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e *Pediococcus*.

No estudo, Zheng *et al.* (2020) avaliaram a taxonomia da família *Lactobacillaceae* baseado em suas sequências genômicas completas. Assim, os pesquisadores propuseram a reclassificação do gênero *Lactobacillus* em 25 gêneros: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e 23 outros novos gêneros. Nos artigos, os autores propõem usar a família *Lactobacillaceae* para incluir todos os gêneros que faziam parte das famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* anteriormente.

A divisão clássica dos *Lactobacillus* está baseada em suas características fermentativas, sendo: 1. Obrigatoriamente homofermentativos; 2. Facultativamente heterofermentativos; e 3. Obrigatoriamente heterofermentativos. Vários *Lactobacillus* obrigatoriamente homofermentativos e facultativamente heterofermentativos e alguns obrigatoriamente heterofermentativos são utilizados em alimentos fermentados. Porém, esse último grupo é comumente associado à deterioração de alimentos (BURITI; SAAD, 2007; VÁSQUEZ *et al.*, 2005).

Os *Lactobacillus* obrigatoriamente homofermentativos incluem aqueles que fermentam glicose exclusivamente em ácido lático e não fermentam pentoses ou gliconato. Exemplos desse grupo são: *Ltb. acidophilus*, *Ltb. gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* e *Ligilactobacillus salivarius* (AXELSSON, 2004; BURITI; SAAD, 2007). Os obrigatoriamente heterofermentativos incluem os *Lactobacillus* que fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás a partir da glicose é uma característica marcante dessas bactérias. São exemplos desse grupo as espécies *Levilactobacillus brevis*, *Lentilactobacillus buchneri subsp. buchneri*, *Limosilactobacillus fermentum* e *Lim. reuteri* (BURITI; SAAD, 2007).

As espécies *Lcb. casei* possuem importante valor comercial para a indústria alimentícia, devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e como culturas

iniciadoras de fermentação na fabricação de queijos para a melhoria de sua qualidade. *Lact. casei* é uma bactéria benéfica encontrada naturalmente na boca e intestinos de seres humanos. Ele produz ácido láctico que ajuda a baixar os níveis de pH no sistema digestivo e impede o crescimento de bactérias nocivas (PEREIRA *et al.*, 2013).

O *Lpb. plantarum* é uma bactéria de ácido láctica não produtora de gás que é geralmente considerada segura (GRAS) com status de Presunção Qualificada de Segurança (QPS). Embora tradicionalmente usado para fermentação de laticínios, carnes e vegetais, *Lpb. plantarum* está ganhando cada vez mais importância como probiótico (LIU; LIONG; TSAI, 2018). Com o recentemente aclamado eixo intestino-corção-cérebro, cepas de *Lpb. plantarum* provaram ser uma espécie valiosa para o desenvolvimento de probióticos, com vários efeitos benéficos na saúde do intestino, distúrbios metabólicos e saúde cerebral (AHN *et al.*, 2018; LIU; LIONG; TSAI, 2018).

Esta bactéria também possui propriedades relevantes não apenas para a fabricação de uma variedade de alimentos e vinhos, mas também para a produção de vitaminas, bacteriocinas, probióticos, antifúngicos e potenciais agentes anticâncer (AHN *et al.*, 2018; EVANOVICH; DE SOUZA MENDONÇA MATTOS; GUERREIRO, 2019; NAMI *et al.*, 2014).

2.1.3.2 Gênero *Bacillus*

Algumas cepas de bactérias formadoras de esporos, tais como *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Bacillus polyfermenticus* e *Bacillus pumilus* têm sido recentemente caracterizadas como potencialmente probióticas. A principal vantagem das cepas probióticas de *Bacillus*, está no fato de sobreviverem melhor às condições gástricas e intestinais adversas em animais em virtude da formação de esporos (ALMADA, 2017).

Bacillus são microrganismos bastonetes Gram-positivos, catalase positiva, aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis e ubíquos. Apesar de serem frequentemente encontrados em solo, sabe-se que estes microrganismos são comensais do trato gastrointestinal, já que têm sido amplamente isolados do trato intestinal de humanos (CUTTING, 2011).

O *B. subtilis* é uma bactéria Gram-positiva não patogênica, amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Esta bactéria recebeu o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), é uma das mais estudadas, tendo seu genoma e características bem elucidadas. As culturas dessa bactéria foram muito populares mundialmente antes da introdução dos antibióticos, pois eram utilizadas como

agentes imunoestimulantes para auxiliar em tratamentos do trato gastrointestinal em toda América e Europa a partir de 1946 (ALVES *et al.*, 2018).

O *B. subtilis*, quando submetido a um ambiente escasso em nutrientes, produz uma célula morfológica distinta chamada esporo (WANG; WANG; YANG, 2017). Esses esporos possuem grande resistência, podendo sobreviver extremos de temperaturas (altas ou baixas), além de outras condições adversas. Ademais, *B. subtilis* tem um histórico de segurança incontestável, pois seus esporos são muito utilizados como probióticos para humanos e animais, em algumas regiões da Ásia e da África, na qual existe um grande consumo de alimentos à base de esporos (DE SOUZA *et al.*, 2014).

2.1.4 Efeitos benéficos dos probióticos e estudos clínicos

Os probióticos são substâncias produzidos por microrganismos que promovem o crescimento de outros microrganismos. Eles atuam como um suplemento nutricional microbiano e afetam benéficamente a saúde humana (NADERI *et al.*, 2014; SAAD, 2006; SOARES; NAVARRO, 2010).

Merece destaque o fato de que esses efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (OLIVEIRA, 2009). Assim, pesquisadores relatam que a regulação da resposta imune da mucosa pelos probióticos, talvez, seja a chave para a manipulação da composição da microbiota e intervenção bem-sucedida em ampla gama de doenças crônicas, incluindo câncer e diabetes mellitus (MIRANDA *et al.*, 2021).

Probióticos são úteis na prevenção de diarreias, causadas por antibióticos e rotavírus, atualmente também têm sido utilizados em doenças atópicas, autoimunes e câncer, sobretudo, devido aos inúmeros trabalhos científicos, que demonstram atividade benéfica destes microrganismos para seu hospedeiro (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

Em pesquisa realizada com 490 pacientes com neoplasia de cólon que estavam em tratamento com radioterapia mostrou que o grupo placebo apresentou mais episódios de diarreia (51,8%) do que o grupo de recebeu um pó liofilizado (31,8%) que continha *Lcb. casei*, *Lpb. plantarum*, *Ltb. acidophilus*, *Ltb. delbrueckii subsp bulgaricus*, *Bifidobacterium longon*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*. Concluiu-se que os probióticos, em questão, apresentaram-se como um fator de proteção e segurança aos pacientes, contribuindo para a redução dos episódios de diarreia (DELIA *et al.*, 2007)

Estudos realizados em diferentes países com um total de 4844 pacientes concluíram que o uso de uma combinação de suplementos à base de *Ltb. acidophilus*, *Ltb. rhamnosus*, *Ltb. bulgaricus* e *Saccharomyces boulardii* reduziram o risco de diarreia associada a antibióticos em 52% (SAZAWAL *et al.*, 2006).

Corrêa *et al.* (2005) e Guarner *et al.* (2011), através de estudos também afirmaram que o tratamento com *Lactobacillus*, bifidobactéria e *Streptococcus* reduziu a frequência de diarreia associada ao uso de antibióticos. Sazawal *et al.* (2006) concluíram que o uso de uma combinação de suplementos à base de *Ltb. acidophilus*, *Ltb. rhamnosus*, *Ltb. bulgaricus* e *Saccharomyces boulardii* reduziram em 8% a diarreia do viajante, em 34% a diarreia oriunda de causas diversas e em 57% a diarreia aguda em crianças, dentro do grupo estudado.

Outro benefício dos probióticos em relação ao trato gastrointestinal é no auxílio sintomático das cólicas abdominais, relacionadas com a motilidade anormal e a síndrome de intestino irritável, onde os probióticos interferem na regulação dos receptores opióides e canabióides das células epiteliais intestinais regulando a dor visceral (CAMILLERI, 2006).

Takada *et al.* (2017) avaliou a qualidade do sono de alunos de medicina saudáveis submetidos ao estresse do exame acadêmico. Para isso, durante 8 semanas antes e 3 semanas após o exame, um total de 94 estudantes receberam a suplementação de *Lcb. casei* (10⁹ UFC/dia) ou placebo. Os pesquisadores verificaram que o consumo diário de *Lcb. casei* foi capaz de manter a qualidade do sono dos estudantes durante um período de estresse crescente.

Estudos clínicos com *Lcb. casei* demonstram sua eficiência na melhoria da constipação e de seus sintomas. Em um estudo aberto com indivíduos constipados, a suplementação de *Lcb. casei* melhorou a constipação dos indivíduos, além de equilibrar a consistência das fezes, sugerindo que a cepa probiótica proporcionou um efeito modulador da microbiota intestinal e produção de ácidos graxos de cadeia curta (CHEN *et al.*, 2019).

Beliavskaia *et al.* (2001) demonstraram que o *B. subtilis* recombinante evitou a imunossupressão causada pelas vacinas replicantes contra Parvovirus e Cinomose, acelerando a formação de clones de memória e aumentando a resposta imune específica devido à ação do interferon $\alpha 2$ secretado pela bactéria no interior do lúmen intestinal.

Estudos tem destacado que esporos de *B. subtilis* podem atuar como adjuvantes vacinais, promovendo a elevação da resposta humoral sérica e de mucosa após a coadministração com antígenos tanto acoplados a superfície ou integrados na forma de esporos recombinantes (DE SOUZA *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2015). Alguns antígenos foram testados com sucesso em esporos de *B. subtilis*, como os antígenos de Rotavírus (LEE *et al.*, 2010), *Helicobacter acinonychis* (HINC *et al.*, 2010), *Escherichia coli* (ISTICATO *et al.*, 2013),

Bacillus anthracis (DUC *et al.*, 2007), tuberculose (DAS *et al.*, 2016), *Helicobacter pylori* (ZHOU *et al.*, 2015), tétano (MAURIELLO *et al.*, 2004) entre outros, indicando este sistema como uma excelente metodologia de apresentação vacinal (ALVES *et al.*, 2018).

Lefevre *et al.* (2015) fizeram um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo e de forma paralela, onde 100 indivíduos com idades entre 60 e 74 anos consumiram o placebo ou o probiótico com esporo de *B. subtilis* diariamente por períodos de 10 dias, de maneira intermitente, alternando com 18 dias de intervalo. Com isto, observaram que o consumo de *B. subtilis* aumentou significativamente as concentrações de IgA secretória nas fezes e saliva em comparação com o placebo. Uma análise *post-hoc* sobre este assunto mostrou uma diminuição da frequência de infecções respiratórias no grupo probiótico em comparação com o grupo placebo. O estudo forneceu evidências de que a suplementação de *B. subtilis* durante o inverno pode ser uma maneira segura e eficaz de estimular respostas imunes em idosos.

Dound *et al.* (2017) realizaram um estudo aberto em 18 indivíduos aparentemente saudáveis. *B. subtilis* foram administradas uma vez por dia por via oral durante 8 semanas. Ao final da oitava semana observou-se redução de IL-6 em torno de 45% e TNF- α em 55%. O probiótico *B. subtilis* foi bem tolerado clinicamente e considerado seguro de acordo com os testes de função de órgãos em todos os indivíduos. Nenhum efeito adverso grave foi relatado durante o período de terapia. Concluindo assim que a dose de 2 bilhões de UFC/dia por 8 semanas foi bem tolerado e sem efeitos colaterais.

A partir dos estudos e comprovações científicas dos benefícios proporcionados pelo consumo de probióticos, fica evidente o crescente aumento no interesse por alimentos contendo microrganismos probióticos. Uma vez que, o uso contínuo desses microrganismos causa equilíbrio da microbiota intestinal, prevenção de desordens intestinais, prevenção doenças digestivas, imunológicas, respiratórias e neurológicas (ALVES *et al.*, 2018; SLYKERMAN *et al.*, 2017).

2.2 MERCADO E DESAFIOS ENVOLVENDO O USO DE PROBIÓTICOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

O avanço nas áreas de ciência e tecnologia de alimentos, nutrição e microbiologia contribuíram para o aumento na demanda por probióticos, contudo é importante que o mercado desenvolva produtos alimentícios não apenas funcionais, mas também com qualidade sensorial e preço acessível.

Os consumidores estão cada vez mais interessados em manter a saúde por meio de alimentos e suplementos alimentares. Buscando satisfazer os consumidores, um mercado cada vez mais variado de alimentos e suplementos vem sendo desenvolvido, e os probióticos ganham um destaque especial (BINDA *et al.*, 2020; MIRANDA *et al.*, 2021). Resultados positivos em pesquisas com probióticos estimulam cada vez mais a fabricação de leites fermentados, iogurtes, queijos, sobremesas, sorvetes, chocolates, cereais, sucos e produtos cárneos (MENESES *et al.*, 2021).

O processamento de alimentos probióticos deve ser criterioso por meio do controle de diversos fatores, como a escolha correta das culturas probióticas a serem utilizadas, o estágio no processamento no qual a(s) cepa(s) será inoculada e a concentração em que se insere este inóculo, bem como o controle das condições de processo e das temperaturas de armazenamento e transporte (MENESES *et al.*, 2021; SILVA; ORLANDELLI, 2019)

Hoje os produtos lácteos fermentados probióticos são os dominantes em volume de vendas e de produtos disponíveis nas prateleiras dos supermercados. Por outro lado, é crescente o número de pessoas intolerantes à lactose, alérgicas às proteínas do leite, adeptas ao vegetarianismo e as que não ingerem produtos lácteos por questões de hábito ou cultura. Assim, a introdução dos probióticos em novas matrizes alimentares, não lácteas, como frutas, produtos cárneos, cereais, chocolates funcionais, entre outros, busca permitir o consumo para esses indivíduos (SOUZA *et al.*, 2020b).

No Brasil no segmento de alimentos probióticos a predominância é dos produtos lácteos, como leite fermentado, iogurte e queijo, devido à conveniência desses processamentos para adição dos probióticos. Uma tendência do mercado é conciliar os efeitos benéficos dos compostos fenólicos presentes em alguns alimentos com os probióticos (SILVA *et al.*, 2017). A Figura 3 mostra exemplos de alimentos probióticos disponíveis no mercado mundial. Alguns segmentos destacam-se como os produtos lácteos, representados pelo sorvete, iogurte, queijo e margarina. Entretanto, devido a algumas dietas com restrições a lactose, outros produtos conquistaram seu espaço no mercado, como é o caso dos sucos de frutas, barras de cereais, creme de avelã.

Figura 3 - Exemplos de alimentos probióticos disponíveis no mercado mundial.

a) margarina; b) queijo; c) barra de cereal; d) queijo minas frescal; e) creme de avelã, amêndoa e amendoim; f) iogurte sabor morango; g) muffin; h) chocolate sem glúten; i) chocolate; j) sucos e água de coco; k) sorvete; l) iogurte natural.



Fonte: Autoria própria.

No Brasil, apesar da diversidade de frutas, o segmento de alimentos probióticos ainda gira em torno dos produtos lácteos, como leite fermentado, iogurte e queijo, devido à conveniência desses processamentos para adição dos probióticos.

Cruxen *et al.* (2017), elaboraram um sorvete de butiá, que além da boa aceitação sensorial, manteve os compostos bioativos e a viabilidade dos probióticos durante a estocagem no estudo. Outro trabalho que explorou a interação entre compostos fenólicos e probióticos é o de Marinho (2016) que elaborou *sorbets* simbióticos de juçara, atendendo uma demanda crescente de dieta com restrição calórica e ao leite. Da Costa *et al.* (2017) avaliou o suco de laranja para a veiculação de probióticos obtendo contagens de até 6,0 log UFC/mL de células viáveis durante 28 dias de estocagem. Além disso, o suco de laranja probiótico foi bem aceito e manteve suas características físico-químicas durante o período de armazenamento.

Silva *et al.* (2017) analisaram uma matriz alimentícia muito atrativa para os consumidores, o chocolate meio amargo. Esse autor adicionou, à composição do chocolate, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BLC1) e *Ltb. acidophilus* (LA3) nas formas livre ou encapsulada. Os produtos foram avaliados sensorialmente por 100 provadores e obtiveram $\geq 75\%$ de intenção de compra.

Outros exemplos de produtos adicionados com cepas probióticas em chocolates, que se mostram como tendência no mercado, podem ser observados nos trabalhos de Hossain *et al.*, (2020); Kobus-Cisowska *et al.* (2019); Marcial-Coba *et al.* (2019).

Marcial-Coba *et al.* (2019) no estudo relataram a manutenção da viabilidade do *Lcb. casei* durante o armazenamento e passagem gástrica *in vitro* quando aplicado em chocolate amargo. A viabilidade de *Lcb. casei* permaneceu estável durante 60 dias.

O estudo de Kobus-Cisowska *et al.* (2019) com o *B. coagulans* em chocolate amargo evidenciou que além da boa viabilidade em *shelf life*, a adição de cepas probióticas ao chocolate não afeta sua qualidade medida a partir da atividade hídrica, acidez e teor de polifenóis. Os resultados do estudo indicam que o chocolate escuro constitui uma matriz adequada para bactérias probióticas *B. coagulans*, e as características sensoriais do chocolate probiótico são semelhantes às do produto tradicional.

Hossain *et al.* (2020) fizeram uma revisão focando nos benefícios à saúde humana associados ao consumo de probióticos e prebióticos. Mostrando o interesse industrial no uso de ambos em novos alimentos e produtos farmacêuticos. Além disso, os autores buscaram trabalhos com ênfase na matriz chocolate, que são um dos produtos mais atraentes entre a maioria das pessoas e pode servir como um transportador adequado para entrega de probióticos no intestino humano, por possuir uma ampla gama de potentes antioxidantes e outros nutrientes que podem afetar positivamente a saúde humana.

2.3 CHOCOLATE

Os padrões de identidade e qualidade de chocolate no Brasil são definidos pela Resolução RDC 264, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA, essa norma estabelece que: “Chocolate: é o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (ou pasta ou liquor) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% (g/100g) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados” (BRASIL, 2005).

Ainda segundo a ANVISA, Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 12, de 1978, o chocolate é classificado como (BRASIL, 1978):

- a) chocolate em pó: produto obtido pela mistura de cacau em pó com açúcar;
- b) chocolate em pó parcialmente desengordurado e chocolate em pó solúvel: produto obtido pela mistura de cacau em pó parcialmente desengordurado ou cacau solúvel, com açúcar;
- c) chocolate ao leite: produto preparado com pasta de cacau, açúcar e leite, leite em pó evaporado ou condensado;
- d) chocolate fantasia ou composto: produto preparado com mistura, em proporções variáveis, de chocolate, adicionado ou não de leite e de outros ingredientes, tais como amêndoa, avelã, amendoim, nozes, mel e outras substâncias alimentícias, que caracterizam o produto; sua denominação estará condicionada ao ingrediente com que foi preparado.
- e) chocolate "*fondant*" e chocolate tipo suíço: produto contendo no mínimo 30% de gordura de cacau, o que abaixa o seu ponto de fusão;
- f) chocolate recheado moldado: produto contendo um recheio de substâncias comestíveis, completamente recoberto de chocolate. O recheio deve diferir nitidamente da cobertura, em sua composição. No mínimo 40% do peso total do produto, devem consistir de chocolate. O produto deve ser denominado chocolate com recheio, seguido da denominação recheio. Ex.: "chocolate com recheio de geléia de frutas";
- g) chocolate amargo (>70% cacau): produto preparado com cacau, pouco açúcar adicionado ou não de leite;
- h) chocolate cobertura: produto preparado com menor proporção de açúcar e maior proporção de manteiga de cacau, empregado no revestimento de bombons e outros produtos, de confeitaria.

Durante a fabricação do chocolate, são utilizados ingredientes obrigatórios como: massa de cacau, manteiga de cacau e açúcar, podendo ou não conter leite. Para que o produto final seja formado, há cinco etapas deste processo: malaxação, refino, conchamento, temperagem e modelagem. No processo de malaxação ocorre a mistura dos ingredientes a fim de homogeneizar formando a massa de cacau. Após este processo, o chocolate passa pelos cilindros de refinação com o objetivo de triturar as partículas de açúcar para deixar a massa mais lisa e uniforme. No conchamento, a massa recebe outra parte de manteiga de cacau, são agitadas constantemente para reduzir a acidez e resultar em maior brilho, sabor e aroma. Após

esta etapa, o chocolate passa por mais dois processos os quais darão a forma sólida (BRAGANTE, 2010). A temperagem é o processo mais importante para a estabilização, brilho e textura do chocolate. É quando o mesmo é aquecido a uma determinada temperatura de acordo com a porcentagem de cacau, resfriado sem choques bruscos de temperatura e elevada a uma temperatura padrão ideal para manter a estabilidade. Para finalizar a operação, é necessária a modelagem, onde o chocolate ganhará a forma desejada, são agitados na forma para perderem as possíveis bolhas de ar, e resfriados em temperaturas não muito baixas, assim que são solidificados desprendem da forma. Em seguida, são embalados e se tornam aptos ao consumo (BORGATO; MELLO, 2018).

Além do sabor agradável, o chocolate é um alimento nutritivo e bastante energético, sua composição é dependente do tipo de chocolate e do processo de fabricação. A Tabela 2 mostra comparação entre a composição média de 3 diferentes tipos de chocolate: amargo, ao leite e branco.

Tabela 2 - Comparação entre os principais nutrientes dos chocolates: amargo, ao leite e branco.

	Amargo	Ao leite	Branco
Energia (Kcal)	530	518	553
Proteínas (g)	5	7	9
Carboidratos (g)	55	57	58
Gordura (g)	32	33	33
Cálcio (mg)	32	224	272
Magnésio (mg)	90	59	27
Ferro (mg)	3	2	0,2

Fonte: BECKETT (2009).

Além de ser considerado um alimento nutritivo que e saboroso, o chocolate atua como fonte de proteínas, gorduras, cálcio, magnésio, ferro, zinco, vitaminas E, B1, B2, B3, B6, B12 e C. Os possíveis efeitos benéficos dependem, além da quantidade consumida, do conteúdo de cacau e de outros componentes, principalmente a gordura e sacarose (DALLABRIDA, 2018). Os efeitos mais nobres do chocolate estão relacionados à substâncias encontradas em abundância em alguns vegetais, que promovem o bom funcionamento dos vasos sanguíneos, que são os flavanóides (SHAHANAS *et al.*, 2019).

Os teores de flavonoides encontrados variam em cada chocolate, sendo o chocolate amargo o que mais apresenta compostos com reconhecida atividade antioxidante (DALLABRIDA, 2018). De acordo com alguns estudos, o consumo moderado de chocolate está associado a redução dos níveis de pressão sanguínea, produção de serotonina provocando

sensações de prazer e bem-estar, estímulo do sistema nervoso central, coração, circulação e rins, reduzindo o cansaço, melhorando a coordenação motora e aumentando a atividade sensorial. Podem apresentar também ações antioxidantes, antihipercolesterolêmicas, anti-inflamatórias, anticancerígenas e neuroprotetoras analgésica e vasodilatadora (SOUZA *et al.*, 2020a). Considerando a busca por melhor qualidade de vida, a escolha por alimentos com propriedades funcionais é cada vez mais comum, recebendo destaque os alimentos com propriedades antioxidantes, conferidas por compostos fenólicos, em especial, os flavanóides (MEDEIROS *et al.*, 2015).

Devido a esses resultados obtidos em pesquisas científicas, o cacau tem sido estudado e considerado como sendo uma das maiores fontes de flavonoides, principalmente os da classe dos flavanóis, que podem se expor na forma monomérica (catequinas e epicatequinas) e condensada, resultando na formação de procianidinas e de proantocianidinas ou taninos condensados, pela associação de várias unidades monoméricas com flavan-3-4-dióis ou leucoantocianidinas (SHAHANAS, PANJIKKARAN, ANEENA, SHARON, & REMYA, 2019)

A composição precisa do chocolate varia em todo o mundo devido a tendências de consumo regional e sua legislação, que se preocupa com as porcentagens de cacau e sólidos do leite adicionais e, quantidade e tipos de gorduras vegetais permitidas (GOMES & NASCIMENTO, 2019; SHAHANAS, PANJIKKARAN, ANEENA, SHARON, & REMYA, 2019)

2.3.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário de plantas e são sintetizados a partir de duas principais vias primárias: via do chiquimato e via do acetato. Dentro dessa classe estão os flavonoides que são derivados da reação de condensação do ácido cinâmico com grupos malonil-CoA. Estes são classificados a partir do nível de oxidação verificado em suas estruturas químicas, sendo os principais: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis (também chamados de flavan-3-óis), isoflavonas e antocianinas (GOMES; NASCIMENTO, 2019). Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau estão dentro das classes dos taninos e dos flavanóides. Os flavanóides presentes incluem flavanóis, flavonóis, antocianinas, flavonas e flavanonas (ONELLI, 2021).

Os polifenóis, ou compostos fenólicos, têm sido amplamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde. Dentre esses efeitos destaca-se sua potente atividade

antioxidante na prevenção de reações oxidativas e formação de radicais livre, o que resulta, inclusive, na proteção contra danos ao DNA das células. Outros efeitos positivos dessas estruturas para a saúde são as propriedades anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiaterogênica, antitrombótica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora, comprovadas em estudos científicos (GOMES; NASCIMENTO, 2019).

Atualmente, é crescente o número de pesquisas que buscam nos alimentos substâncias capazes de auxiliar o combate ao estresse oxidativo. O organismo encontra-se nessa situação quando há desequilíbrio entre a formação de moléculas oxidantes e a presença de antioxidantes (endógenos e exógenos) (SHAHANAS *et al.*, 2019)

Esse dano oxidativo está relacionado com a etiologia de várias doenças: como a aterosclerose, as cardiopatias e até a diabetes mellitus. O excesso de radicais livres é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Essas substâncias agem como doador rápido de hidrogênio e elétrons e sua estrutura química é ideal para o sequestro dos radicais livres e quelação de íons de metais, (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os compostos fenólicos em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos (GOMES; NASCIMENTO, 2019).

Sabe-se que o cacau fresco é uma das mais altas fontes naturais de compostos polifenólicos (principalmente epicatequina, catequina, procianidinas e antocianinas), além das metilxantinas (por exemplo, teobromina e cafeína) que foram descritas como tendo papel importante na preservação da saúde humana, entretanto, a biodisponibilidade desses compostos pode variar de acordo com a variedade do cacau, bem como pelas condições climáticas, região de cultivo e processo de torra (DJIKENG *et al.*, 2018; MARTINI; CONTE; TAGLIAZUCCHI, 2017).

As epicatequinas e catequinas têm sido reportadas como os principais flavanóides monoméricos do cacau, elas possuem diferentes características; como atividade antioxidante, capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio, capacidade quelante de metais como ferro e cobre, e potencial para produção de peróxido de hidrogênio na presença de alguns metais (SIM *et al.*, 2016).

Estudos apontam que a funcionalidade dos probióticos pode ser potencializada quando incorporados em matrizes ricas em compostos fenólicos, melhorando a absorção desses, ao

mesmo tempo em que os metabólitos polifenólicos podem influenciar a multiplicação de algumas espécies bacterianas (VALDÉS *et al.*, 2015).

Em relação ao efeito antimicrobiano dos compostos fenólicos, foi verificado em experimentos *in vitro* que o extrato de semente de uva contendo teor total de fenólicos entre 279 e 414 mg/g promoveu o crescimento de bactérias benéficas (*Lactobacillus* spp.) e diminuiu as contagens de bactérias indesejáveis como *Clostridium histolyticum* (CUEVA *et al.*, 2013).

O chocolate pode ser uma boa alternativa para amplificar a variedade e o acesso de funcionais ao consumidor (GADHIYA; PATEL; PRAJAPATI, 2016; KOBUS-CISOWSKA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017; TOKER *et al.*, 2017). Além disso, os compostos fenólicos do chocolate também podem desempenhar um papel importante no retardo do estresse oxidativo em probióticos, que é uma das principais causas de morte de probióticos em alimentos, levando a uma melhor viabilidade e *shelf life* (PEREIRA *et al.*, 2013). Alguns estudos mostram também que a manteiga de cacau pode proteger os microrganismos probióticos da água e íons H⁺ (SILVA *et al.*, 2017).

Estudos feitos com o chocolate ao leite e amargo estocados a temperaturas de refrigeração verificaram seu potencial como matriz alimentar (GADHIYA; PATEL; PRAJAPATI, 2016). No entanto, são escassos trabalhos de verificação de viabilidade dos probióticos estocados a temperatura ambiente, que seria a condição ideal para que essa matriz possa ser mais facilmente comercializada (SILVA *et al.*, 2017). São escassos ainda estudos para selecionar espécies potencialmente probióticas que possam ser utilizadas em matriz chocolate mantendo a sua viabilidade.

2.4 DESAFIOS NA PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO PROBIÓTICO

Os microrganismos probióticos precisam sobreviver ao processamento dos alimentos, ao *shelf life* e a passagem pelo trato gastrointestinal para que os seus benefícios sejam garantidos ao consumidor, desafiando assim a indústria de alimentos a encontrar novas alternativas para incorporá-los aos alimentos.

Parâmetros como alta temperatura, variações de pH e oxigênio podem afetar a sobrevivência do probiótico (FAVARO-TRINDADE, 2011; FREIRE *et al.*, 2021; TRIPATHI; GIRI, 2014). No intuito de proteger os microrganismos a microencapsulação de probióticos é considerada uma alternativa para a sua sobrevivência sob condições gastrointestinais e por melhorar a viabilidade durante o *shelf life* mantendo seus benefícios à saúde do consumidor (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017).

2.5 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma técnica relativamente recente, configura-se como uma tecnologia que promove o revestimento fino de partículas sólidas, gotas de líquidos, microrganismos e dispersões (BARROSO *et al.*, 2021). É um processo de imobilização ou compartimentalização por cápsulas cujo tamanho está entre 1 μm e 1000 μm . É uma tecnologia que vem sendo empregada na indústria de cosméticos, produtos farmacêuticos, agrotóxicos e alimentos e, nesta, é usado em aromas, ácidos, óleos, vitaminas, microrganismos, entre outros (MARTINS *et al.*, 2017). Um possível design comumente usado para o encapsulamento de células microbianas envolve a microesfera, em que células vivas são incorporadas e imobilizadas aleatoriamente em uma matriz contínua. A microencapsulação ajuda a proteger a célula microbiana do ambiente, melhorando assim sua estabilidade (BARROSO *et al.*, 2021). A estrutura formada pelo agente de microencapsulação em torno do núcleo é composta por um material semipermeável, ao mesmo tempo fino e relativamente forte (KAILASAPATHY, 2002). Além disso diminui as interações da substância encapsulada em relação aos fatores ambientais. Dessa forma preserva as características sensoriais e nutricionais alimentos, facilita a incorporação da substância encapsulada em diferentes tipos de matrizes (VIANA *et al.*, 2021).

Na indústria alimentícia, essa técnica tem solucionado limitações no emprego de ingredientes, visto que pode suprimir ou atenuar *flavors* indesejáveis, reduzir a volatilidade e aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (BARROSO *et al.*, 2021). Vários métodos de microencapsulamento são estudados, e há uma grande tendência de crescimento à medida que vão surgindo novos materiais encapsulantes e princípios ativos que requeiram processamentos específicos (FREIRE *et al.*, 2021; VIANA *et al.*, 2021).

Vários fatores determinam a sobrevivência dos microrganismos probióticos adicionados em alimentos, como às propriedades endógenas da cepa, processamento, características físico-químicas do alimento, como atividade de água, umidade, concentração dos ingredientes, presença de oxigênio, além do processo digestivo (FREIRE *et al.*, 2021). Durante o processo digestivo ocorre uma sequência de condições que podem causar injúria às células bacterianas, como o meio ácido do estômago, os sais biliares e enzimas pancreáticas no intestino delgado. Os sais biliares apresentam natureza antimicrobiana, pois dissolvem a membrana do micro-organismo (KLEEREBEZEM; VAUGHAN, 2009).

A tecnologia de encapsulação pode aumentar a sobrevivência do probiótico durante a estocagem do alimento, assim como promover a entrega bem-sucedida de probióticos ao trato gastrointestinal. É desejável que a adição das microcápsulas probióticas não altere as características sensoriais do alimento (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; SILVA, 2016).

A encapsulação pode produzir dois tipos básicos de estruturas, sendo que em função da distribuição do recheio recebem nomenclaturas diferentes. Quando a partícula é mononucleada, ou seja, o recheio é envolvido por uma película de parede, a microcápsula é denominada do tipo “reservatório”, mas se o recheio se distribui ao longo do material, a micropartícula é denominada do tipo “esponja” ou matriz (SILVA *et al.*, 2014; ZUIDAM; SHIMONI, 2010).

As propriedades dos agentes encapsulantes determinam os mecanismos de liberação dos probióticos das partículas. Alguns exemplos de mecanismos de liberação são: variação do pH e da temperatura, solubilidade do meio, ruptura mecânica e gradiente de concentração do meio (FAVARO-TRINDADE, 2011). Portanto, a matriz de encapsulação ou carreador deve oferecer boa proteção contra o meio ácido melhorando a resistência do probiótico ao processo digestivo (SILVA, 2016).

Existem diferentes métodos para a produção de microcápsulas, que podem ser, em geral, divididos em três grupos: físico-químicos (coacervação simples ou complexa (separação de fase aquosa), evaporação emulsão solvente (separação por fase orgânica), emulsão solidificação e envolvimento lipossômico), métodos físicos (*spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, gelificação iônica, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização) e os métodos químicos (polimerização interfacial e inclusão molecular) (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017).

A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, como: tamanho de partículas requeridas, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo. Dentre as principais técnicas empregadas para a encapsulação de probióticos estão a atomização por *spray-drying*, *spray-chilling*, *spray-coating*, extrusão, coacervação e emulsificação (HUQ *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2021). Neste trabalho a técnica utilizada será a da gelificação iônica, como ferramenta para melhorar a proteção das cepas potencialmente probióticas estudadas.

2.5.1 Métodos

2.5.1.1. Coacervação simples

Este é o método de microencapsulação mais antigo, baseia-se na técnica de separação de fases por coacervação (SUAVE *et al.*, 2006). A obtenção de um sistema coloidal, a partir de uma solução contendo uma macromolécula dispersa, que apresenta duas fases líquidas imiscíveis. A fase mais concentrada no componente coloidal é o coacervado e a outra fase é a solução de equilíbrio. A fase coacervado apresenta-se no estado disperso com gotículas de líquido amorfo, que acabam por coalescer, formando uma camada contínua que se deposita à volta do material a encapsular (núcleo). Posteriormente, verifica-se a solidificação do revestimento e o isolamento das micropartículas (DONG; BODMEIER, 2006). Na coacervação complexa, ocorre o mesmo processo da coacervação simples, no entanto, envolve dois ou mais colóides hidrófilos de cargas opostas (gelatina e goma acácia ou gelatina e polissacarídeos) (SUAVE *et al.*, 2006).

2.5.1.2 Evaporação/emulsão do solvente

A denominação de evaporação/emulsão do solvente é normalmente usada para designar um conjunto de procedimentos laboratoriais nos quais ocorre a formação de uma emulsão que pode ser do tipo O/A, A/O, A/O/A e O/A/O. A fase interna, onde está dissolvido o agente encapsulante, é um solvente orgânico que tem uma solubilidade limitada na fase externa da emulsão, que corresponde ao meio não-solvente (SUAVE *et al.*, 2006).

A substância a encapsular encontra-se dispersa ou dissolvida na fase interna, sendo posteriormente emulsionada na fase externa, que possui um agente tensoativo. A presença deste composto tem como objetivo prevenir a coalescência ou a agregação das partículas (SUAVE *et al.*, 2006). O solvente orgânico presente é depois removido por evaporação sob agitação contínua. As micropartículas formadas são posteriormente submetidas a operações complementares, como a separação, a lavagem e a secagem (ZANETTI; SOLDI; LEMOS-SENNA, 2002).

A técnica de emulsão pode ser aplicada para a microencapsulação de bactérias ácido lácticas (BAL), as cápsulas são formadas a partir de duas etapas: a dispersão de uma fase aquosa, contendo as células bacterianas e uma suspensão polimérica, dentro de uma fase orgânica, como óleo, resultando em uma emulsão de água em óleo; e a solidificação das cápsulas por um agente

gelificante. A emulsificação normalmente resulta em cápsulas de pequenos diâmetros, além de ser facilmente aplicada em grande escala (MORTAZAVIAN *et al.*, 2007), porém, pode produzir microcápsulas com grandes variações de tamanho e forma (KENT; DOHERTY, 2014; VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017).

2.5.1.3 *Spray-drying*

A secagem por *spray-dryer* é uma das predominantes na indústria de alimentícias, principalmente na indústria de laticínios. Esse processo consiste na remoção parcial da água contida no produto, viabilizando o armazenamento, conservação por períodos mais longos e redução de custos logísticos. É uma das técnicas mais amplamente utilizadas em função da capacidade de uso de vários agentes encapsulantes, estabilidade do produto final, fácil manuseio do equipamento, rápida solubilidade da cápsula, além do baixo custo (SILVA *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2021).

A microencapsulação por *spray-drying* envolve a dispersão das células em uma solução polimérica que é atomizada na câmara de secagem (SILVA, 2016). Isso leva a evaporação do solvente e, conseqüentemente, a formação das microcápsulas (MARTÍN *et al.*, 2015; VIANA *et al.*, 2021). Este processo pode ser operado continuamente, porém apresenta como desvantagem, a temperatura usada no processo (MARTÍN *et al.*, 2015).

2.5.1.4 *Spray-chilling*

A microencapsulação por *spray-chilling*, também conhecido como *spray-cooling* e *spray-congealing*, é uma técnica semelhante ao *spray-drying*. No entanto, fundamenta-se na injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula. As micropartículas são produzidas por uma mistura contendo o ingrediente ativo (ou recheio) e o agente encapsulante na forma de gotículas. Essa mistura é pulverizada por um atomizador ou bico aspersor e entra em uma câmara, na qual o ar circula a baixa temperatura (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

2.5.1.5 *Gelificação iônica*

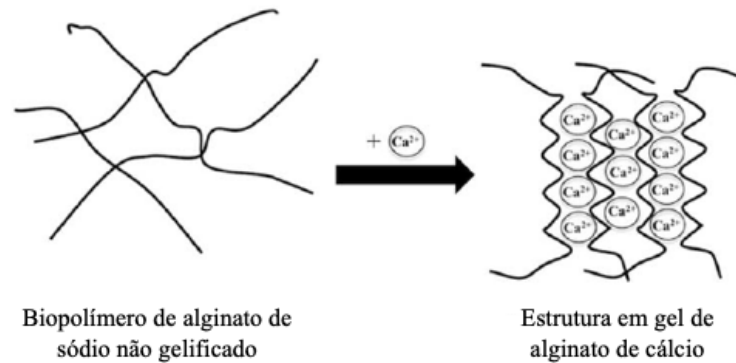
A gelificação iônica ocorre por ligação de um hidrocolóide com íons, tipicamente gelificação de polissacarídeos negativamente carregados mediada por cátions, por exemplo, entre alginato, carragena ou pectina com íons como o cálcio (BUŠIĆ *et al.*, 2018).

A gelificação iônica é uma técnica físico-química de produção de esferas ou cápsulas, que se baseia na interação eletrostática entre polímeros iônicos e íons de cargas opostas de modo a formar uma rede tridimensional, promovendo assim a formação de géis. Algumas de suas vantagens em relação às outras técnicas estão a simplicidade do método, a não utilização de solventes orgânicos e a temperatura ambiente para a produção das partículas (ALMEIDA, 2019).

Esta é uma técnica simples e eficaz, onde um composto é encapsulado com uma fina camada de material protetor, melhorando sua estabilidade, palatabilidade e proporcionando contra interações ambientais ou químicas (CARMO et al., 2015). Este método pode ser realizado a temperatura ambiente, não necessita do uso de solventes e pH extremos. Estas vantagens têm sido motivo de sua utilização crescente, principalmente na encapsulação de fármacos, células vivas imobilizadas e inclusão de compostos de interesse em alimentos. Ademais, este método permite encapsular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (MCCLEMENTS, 2017; SAMPAIO, 2018).

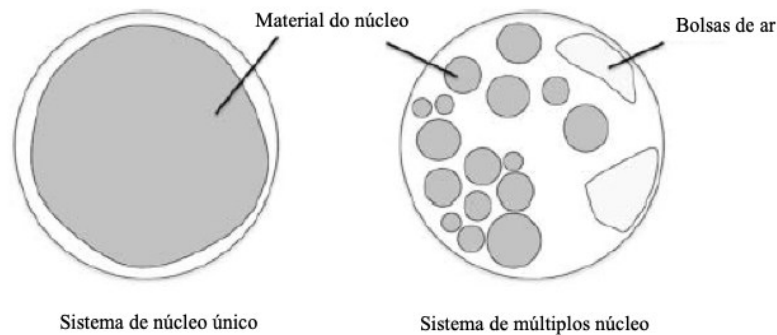
A gelificação iônica é conduzida primeiramente pela homogeneização do composto ativo com o polissacarídeo. Em seguida, esta solução biopolimérica é gotejada ou atomizada sob uma solução iônica contendo íons divalentes. As partículas são formadas imediatamente após o contato da solução polimérica com o banho gelificante, contendo um elevado teor de água. O endurecimento inicia da superfície externa para o interior das esferas, através da difusão dos íons para cadeia do polissacarídeo carregada negativamente, resultando em um rearranjo estrutural tridimensional rígido devido à complexação (MCCLEMENTS, 2017). A rigidez e resistência das partículas são influenciadas pelo tempo que elas ficam em contato com a solução gelificante contendo os íons divalentes, após o gotejamento da solução polimérica (SAMPALIO, 2018). As Figuras 4 e 5 demonstram com mais detalhes a estrutura da molécula durante o processo de gelificação iônica, utilizando o alginato, e a possível disposição interna do material do núcleo encapsulado em uma partícula de gel de alginato, respectivamente.

Figura 4 - Formação da estrutura da molécula durante a gelificação iônica do alginato de sódio.



Fonte: CHING; BANSAL; BHANDARI (2017).

Figura 5- Possível disposição interna do material do núcleo encapsulado em uma partícula de gel de alginato.



Fonte: CHING, BANSAL; BHANDARI (2017).

2.5.1.6 Leito fluidizado

A microencapsulação por leito fluidizado baseia-se em colocar os componentes da formulação a preparar num reator de leito fluidizado, onde uma corrente de ar quente, em alta velocidade, é forçada a atravessar as partículas sólidas do agente a encapsular, formando o leito fluidizado. No interior da câmara de revestimento, as partículas sólidas do núcleo são revestidas por nebulização de uma solução, dispersão ou emulsão do agente encapsulante ou mesmo uma massa fundida, com temperatura e humidade controladas (TEWES; BOURY; BENOIT, 2006). Este método pode ser aplicado com agentes encapsulantes que fundam facilmente (e.g. óleos vegetais hidrogenados, ácidos gordos, ceras) ou que sejam solúveis (e.g. amido, gomas e maltodextrinas) (GOUIN, 2004).

2.5.1.7 Extrusão

Dentre as técnicas de microencapsulação de probióticos, a extrusão é a mais popularmente empregada, devido ao baixo custo e simplicidade, além de não envolver altas temperaturas (KENT; DOHERTY, 2014). No método o material do núcleo na forma líquida, fundido ou em solução, é lançado através do orifício de um tubo fino ou seringa para formar microgotas, cujo tamanho será dependente do diâmetro do orifício e da velocidade de saída do material. As gotas contêm o material de revestimento ou este é adicionado quando as gotas caem ou são injetadas. A solidificação do material de revestimento pode ocorrer por evaporação do solvente, difusão do solvente ou reação química (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).

Na Tabela 3, temos descritas algumas das principais vantagens, desvantagens e aplicações dos métodos mais utilizados para a microencapsulação na indústria de alimentos, e fármacos.

Tabela 3- Principais vantagens, desvantagens e aplicações dos métodos de microencapsulação.

Método	Vantagens	Desvantagens	Aplicações	Referência
Coacervação simples ou complexa	Técnica versátil; Maior controle do tamanho das partículas.	Aglomerção das partículas; Utilização de aldeído.	Indústria de alimentos, vitaminas, enzimas, proteínas e medicamentos.	(JAMEKHORS HID; SADRAMELI; FARID, 2014)
Evaporação emulsão solvente	Simples; Baixo custo.	Produção em escala laboratorial.	Indústria de fármacos.	(LI; ROUAUD; PONCELET, 2008)
Emulsão solidificação	Pode ser usada em escala industrial.	Microcápsulas com variação de tamanho e forma; Custo elevado.	Utilizada na indústria de alimentos, encapsulação de probióticos.	(KENT; DOHERTY, 2014)
<i>Spray drying</i>	Baixo custo; Equipamento e técnica acessível; Produção em escala industrial; Solubilização instantânea; Estabilidade elevada das cápsulas.	Microcápsulas não uniformes; Perda de materiais sensíveis ao calor.	Amplamente utilizada na indústria de alimentos, encapsulação de probióticos, indústria farmacêutica e química.	(KENT; DOHERTY, 2014; MARTÍN <i>et al.</i> , 2015; SILVA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Spray chilling</i>	Envolve baixas temperaturas; Econômico; Pode usar lipídios como material de parede.	Baixa capacidade de encapsulação e expulsão do material do núcleo durante o armazenamento.	Indústria de alimentos, vitaminas, enzimas, probióticos e medicamentos.	(PEDROSO <i>et al.</i> , 2012)
Extrusão	Baixo custo; Simples; Não envolve altas temperaturas; Pode ser usado aeróbico e anaeróbico.	Método mais trabalhoso; Necessita avanços tecnológicos para produção em escala industrial.	Amplamente utilizada na indústria de alimentos e encapsulação de probióticos.	(FAVARO-TRINDADE, 2011; KENT; DOHERTY, 2014)
Gelificação iônica	Baixa temperatura; Baixo custo.	Alta permeabilidade.	Indústria farmacêutica.	(JAMEKHORS HID; SADRAMELI; FARID, 2014)

Fonte: VANISKI, CORTI & DRUNKLER (2017).

2.5.2 Agentes encapsulantes

Os agentes encapsulantes se enquadram na categoria de formadores de filmes, que podem ser selecionados de uma ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos (ASSUNÇÃO *et al.*, 2014; VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017). A escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores: a não reatividade com o material a ser

encapsulado durante o processo e estocagem; o processo utilizado para a formação da microcápsula; o mecanismo e liberação do material encapsulado; suas propriedades reológicas; a habilidade de dispersar ou emulsificar; a capacidade de prover máxima proteção para o material a ser encapsulado contra condições desfavoráveis, como alimentos com alta atividade de água (WEINBRECK; BODNÁR; MARCO, 2010), temperatura e presença de oxigênio atmosférico, (ANAL; SINGH, 2007) das condições ácidas do estômago e os sucos biliares do intestino delgado (KENT; DOHERTY, 2014), e ser economicamente viável (ASSUNÇÃO *et al.*, 2014).

A utilização de solventes orgânicos é necessária para alguns tipos de polímeros, o que impede o seu uso na encapsulação de organismos vivos. Este inconveniente tem despertado o interesse no desenvolvimento e utilização de polímeros passíveis de serem utilizados em meio aquoso, especialmente para a encapsulação de microrganismos (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017). Muitos materiais podem ser utilizados como cobertura para as microcápsulas com destaque aos carboidratos, proteínas e lipídios. Polissacarídeos tais como amido, carragena, alginato e goma gelana são os materiais mais comumente empregados na microencapsulação de *Bifidobactérias* e *Lactobacillus* (HUQ *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014; TRIPATHI; GIRI, 2014; VIANA *et al.*, 2021).

O alginato de cálcio é um biopolímero extraído de diferentes espécies de macroalgas, principalmente algas marrons, tais como: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystid pyrifera* (GOMBOTZ, 1998). É um material bastante utilizado na microencapsulação de células bacterianas por suas características de formação de gel que ocorre rapidamente na presença de íons cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, sendo assim a viabilidade dos microrganismos microencapsulados podem ser conservadas quando empregado este material (FAVARIN, 2014; TRIPATHI; GIRI, 2014; VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017).

Além disso, o alginato de cálcio apresenta baixo custo, grande disponibilidade no mercado, possibilidade de emprego em escala industrial e aceitação da substância como aditivos na produção de alimentos (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram utilizadas as cepas indicadas na Tabela 1, sendo duas delas provenientes do cépario do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e uma comercial. As cepas de BAL foram mantidas sob congelamento a -20 °C em tubos tipo *ependorf* contendo caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e glicerol (Quimibrás AS, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) 33%. A cepa *B. subtilis* foi gentilmente cedida pela empresa italiana *Synergia Life Sciences*. A empresa Nanovetores Group doou os materiais poliméricos e lipídicos utilizados na composição das micropartículas.

Tabela 4 - Microrganismos utilizados no projeto.

Microrganismo	Biotipo/ identificação	Fonte
<i>Lpb. Plantarum</i>	LBP UFSC023	UFSC
<i>Lcb. Casei</i>	LBP UFSC019	UFSC
<i>B. subtilis</i>	NCIBM 30283	Synergia

Fonte: Autora. (2022)

No estudo foram utilizadas duas matrizes de chocolate comercial: chocolate ao leite e chocolate 70% cacau vegano. Suas composições nutricionais estão descritas na Tabela 5. O chocolate 70% cacau vegano possui os seguintes ingredientes: cacau e manteiga de cacau orgânicos, açúcar de coco e lecitina de girassol. Enquanto o chocolate ao leite possui: açúcar, leite em pó integral, massa de cacau, manteiga de cacau, soro de leite em pó, gordura vegetal, gordura de manteiga desidratada, emulsificantes: lecitina de soja, poliglicerol polirricinoleato e aromatizantes.

Tabela 5- Informação nutricional dos chocolates.

Porção de 25g	Chocolate ao leite (CL)	Chocolate 70% vegano (C70)
Valor energético	133kcal	139kcal
Carboidratos	15g	12g
Proteínas	1,6g	1,7g
Gorduras totais	7,2g	10g
Gorduras saturadas	4,2g	6,5g
Gorduras <i>Trans</i>	0g	0g
Fibra alimentar	0g	4,2g
Sódio	46mg	0mg

Fonte: Autora. (2022)

3.2 TRATAMENTOS

A microencapsulação foi realizada pela técnica de gelificação iônica, as concentrações das cepas foram previamente determinadas para a obtenção de micropartículas com contagem entre 9-10 log UFC/g. O arranjo dos tratamentos propostos pode ser observados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6- Tratamentos realizados com o *Lactiplantibacillus plantarum* (LP) referentes a microencapsulação e incorporação na matriz chocolate.

Amostras	Livre	Encapsulado por geleificação iônica
LP-L = livre	X	-
LP-ME = microencapsulado	-	X
LP-MEG = microencapsulado refrigerado	-	X
LP-CLL = Chocolate ao leite + cepa livre	X	-
LP-CLME = Chocolate ao leite + cepa microencapsulada	-	X
LP-C70L = Chocolate 70% + cepa livre	X	-
LP-C70ME = Chocolate 70% + cepa microencapsulada	-	X

Fonte: Autora. (2022)

Tabela 7- Tratamentos realizados com o *Lacticaseibacillus casei* (LC) referentes a microencapsulação e incorporação na matriz chocolate.

Amostras	Livre	Encapsulado por geleificação iônica
LC-L = livre	X	-
LC-ME = microencapsulado	-	X
LC-MEG = microencapsulado refrigerado	-	X
LC-CLL = Chocolate ao leite + cepa livre	X	-
LC-CLME = Chocolate ao leite + cepa microencapsulada	-	X
LC-C70L = Chocolate 70% + cepa livre	X	-
LC-C70ME = Chocolate 70% + cepa microencapsulada	-	X

Fonte: Autora. (2022)

Tabela 8- Tratamentos realizados com o *Bacillus subtilis* (BS) referentes a microencapsulação e incorporação na matriz chocolate.

Amostras	Livre	Encapsulado por geleificação iônica
BS-L = livre	X	-
BS-ME = microencapsulado	-	X
BS-MEG = microencapsulado refrigerado	-	X
BS-CLL = Chocolate ao leite + cepa livre	X	-
BS-CLME = Chocolate ao leite + cepa microencapsulada	-	X
BS-C70L = Chocolate 70% + cepa livre	X	-
BS-C70ME = Chocolate 70% + cepa microencapsulada	-	X

Fonte: Autora. (2022)

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Preparo dos inóculos microbianos

O procedimento de recuperação do estoque congelado das cepas de *Lpb plantarum* e *Lcb. casei* consistiu na reativação por três vezes consecutivas em caldo MRS a 37 °C por 24 h, em jarra de anaerobiose com sistema Anaerocult (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany), centrifugação a $5.000 \times g$ por 5 min, lavados duas vezes em solução de *ringer* (Oxoid) e

ressuspensas na mesma solução. Uma suspensão bacteriana foi obtida com contagem final superior a 9 log UFC/mL.

Os endosporos de *B. subtilis* não passaram por processo de reativação anterior ao seu microencapsulamento. A fim de garantir que a contagem incorporada estivesse acima de 9 log UFC/mL foi realizado um controle inicial de viabilidade conforme descrito no item 4.3.2, seguindo as orientações do fornecedor.

3.3.2 Enumeração dos microrganismos

Para enumeração das cepas de BAL e do *B. subtilis* livres e microencapsulados foi utilizada uma solução de água peptonada a 0,1% (p/v); no caso das cepas microencapsuladas, a solução de foi aquecida previamente à temperatura de 40 °C. utilizou-se equipamento do tipo *stomacher* (Marconi, modelo MA 440/CF, SP, Brasil) durante 15 min para viabilizar a completa fusão do material de parede, possibilitando a liberação total dos microrganismos. Após diluições seriadas, alíquotas foram inoculadas em ágar MRS para as cepas de BAL e ágar nutriente (Biokar, Beauvais, França) para *B. subtilis*, e incubados a 37 °C em jarras de anaerobiose por 48 h e a 30 °C em aerobiose por 24 h, respectivamente, de acordo com Silva et al. (2017), com adaptações. Os resultados foram expressos como log UFC/g. as análises foram realizadas em triplicata com duas repetições independentes.

3.3.3 Microencapsulação

A confecção das micropartículas foi realizada em parceria na empresa Nanovetores Group. Foram utilizados sistemas encapsulantes que combinam polímeros e gorduras de grau alimentício. O método utilizado foi o de geleificação iônica com adaptações. Esses sistemas são confidenciais protegidos por domínio da empresa parceira.

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

Para a avaliação da morfologia das micropartículas foi utilizado um microscópio óptico invertido Olympus CKX53 (BEL Photonics – Milão, Itália), equipado com câmera e *software* BEL View v.62, as imagens foram feitas em aumento 40X- com contraste de fase. Para a MEV foi utilizado um microscópio *Tabletop Microscope Hitachi* TM 300 (Tóquio, Japão).

As micropartículas foram fixadas em uma fita de carbono dupla face (Ted Pella, Inc. – Redding, EUA) e adicionadas em uma base de alumínio.

3.3.5 Avaliação da sobrevivência dos microrganismos aos processos de encapsulação

Para a avaliação da resistência dos microrganismos ao processo de microencapsulação por geleificação iônica, as células viáveis foram enumeradas antes do processo de encapsulação, como controle e após o processo. As contagens foram executadas de acordo com o método previamente citado na seção 4.3.2.

3.3.6 Viabilidade das cepas durante o armazenamento

Foram realizadas contagens dos microrganismos livres e encapsulados, durante o período de armazenamento em temperatura ambiente e refrigerado, nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias. A enumeração foi realizada como descrito no item 4.3.2.

3.3.7 Aplicação das cepas nos chocolates

Os probióticos foram reativados e propagados como descrito nos itens 4.3.1. e 4.3.2, respectivamente. A concentração das cepas foi ajustada para contagem de células viáveis de aproximadamente 9,0 log UFC/mL. Posteriormente, 1% (m/v) da cultura microbiana foi adicionada aos chocolates. A mesma proporção de 1% foi usada como inóculo para os probióticos microencapsulados.

3.3.8 Atividade de água e pH das amostras de chocolate

As amostras de chocolates foram avaliadas em relação a sua atividade de água (aw), sendo medidas com o auxílio de um equipamento Aqualab (Decagon Devices, EUA). Os valores obtidos foram expressos entre zero e um. Para medir o pH do chocolate foi pesado 5 g da amostra, cortada em pequenos pedaços, e adicionada de 50 mL de água deionizada. A mistura foi mantida sob agitação pelo período de 20 minutos, em seguida sendo registrado o pH da amostra com o auxílio de um potenciômetro. Essas análises foram realizadas no tempo 0 e 90 dias.

3.3.9 Viabilidade das cepas em amostras de chocolate durante o armazenamento

A viabilidade dos probióticos pode ser afetada durante a estocagem do chocolate, assim a enumeração desses microrganismos é essencial durante o armazenamento. Os chocolates foram mantidos durante o *shelf life* em temperatura ambiente. Aproximadamente 5 g de cada amostra de chocolate foram diluídas em 45 mL em água peptonada 0,1% (p/vol) previamente aquecido a 40 °C. Após a homogeneização por 15 min em stomacher, alíquotas de 1 mL foram coletadas, diluídas serialmente e inoculadas em ágar MRS (*Lactobacillus*) e ágar nutriente (*Bacillus*). Em seguida, as placas inoculadas foram incubadas por 48 h a 37 °C em jarras de anaerobiose (*Lactobacillus*) e 24 h a 30°C em aerobiose (*Bacillus*). Os resultados foram expressos como log UFC/g de chocolate. Essa análise foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias.

3.3.10 Sobrevivência das cepas na forma livre e microencapsulada na matriz chocolate, durante a simulação gastrointestinal *in vitro*

Os chocolates adicionados das cepas que obtiveram os melhores resultados durante o armazenamento foram analisados no ensaio de digestibilidade *in vitro*. Utilizou-se 5 g de cada amostra de chocolate, logo após o preparo, para avaliar a sobrevivência bacteriana ao longo das fases oral, fase gástrica e fase intestinal, utilizando o protocolo descrito por Brodkorb *et al.* (2019). Todo o ensaio foi conduzido a 37 °C, bem como foi utilizada agitação orbital a fim de simular a temperatura corpórea e os movimentos peristálticos. Em detalhes, na fase oral a amostra foi homogeneizada na proporção 1:1 (m/m) com fluido salivar simulado (SSF) (Tabela 9). Esta mistura foi então adicionada de amilase salivar (75 U/mL) e agitada por 2 min à 150rpm. Na fase gástrica, o bolo oral foi adicionado de fluido gástrico simulado (SGF) (Tabela 9) até atingir uma proporção final de 1:1 (v/v). Foi utilizada pepsina na concentração de 2000 U/mL, bem como o pH desta fase foi ajustado para 3,0 utilizando HCl 1 M. As amostras foram incubadas por 2h com agitação de 45rpm. Na fase intestinal, o quimo gástrico foi adicionado de fluido intestinal simulado (SIF) (Tabela 9) até atingir uma proporção final de 1:1 (v/v). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 M, seguido da adição da 10 mM. sais de bile e pancreatina (100 U/mL baseada na atividade da tripsina). A incubação da fase intestinal levou 2h adicionais à 45 rpm. Após cada etapa da simulação gastrointestinal, o volume resultante das fases aumentou (assim como ocorre naturalmente), portanto, a diluição foi corrigida para a

avaliação da concentração microbiana. A sobrevivência das cepas aplicadas nos chocolates foi analisada conforme descrito item 4.3.2. em log UFC/g.

Tabela 9 – Descrição da composição dos fluidos utilizados nas análises gastro-intestinais.

Solução de sal adicionada	Concentrações estoque		Concentração final de SSF - pH 7 (mM)	Concentração final de sal em SGF - pH 3 (mM)	Concentração final de sal em SIF - pH 7 (mM)
	(g/L)	(M)			
KCl	37.3	0.5	15.1	69	6.8
KH ₂ PO ₄	68	0.5	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	84	1	13.6	25	85
NaCl	117	2	-	47.2	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.15	0.15	0,12	-
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.5	0.06	0.5	-
HCl		6	1.1	15.6	8.4
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44.1	0.3	1.5	0.15	0.6

Fonte: Autora (2022).

3.3.11 Análise dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante das amostras de chocolate contendo as cepas potencialmente probióticas livres e encapsuladas

3.3.11.1 Obtenção dos extratos/amostras

As análises de capacidade antioxidante *in vitro* foram feitas na matriz chocolate através da extração aquosa, antes de ser submetido à digestão e depois de cada etapa do ensaio de digestão *in vitro*. Foram analisadas as amostras de chocolate ao leite e chocolate 70% cacau, *in natura* e também adicionadas das cepas *Lcb. casei* e *B. subtilis* em sua forma livre e encapsulada. As análises foram realizadas em triplicata e os valores apresentados como a média e desvio padrão.

3.3.11.2 Determinação da capacidade de redução de Folin-Ciocalteu das amostras de chocolate

Para determinação do teor de compostos fenólicos totais (TFT) dos extratos, foi utilizada a metodologia descrita por Singleton; Rossi (1965), com adaptações. Na presença de agentes redutores como os compostos fenólicos, molibdênio e tungstênio, que estão no estado de oxidação 6+, reagem através da transferência de elétrons, e, em meio alcalino, formam um complexo azul. A intensidade dessa cor varia com a quantidade de substâncias redutoras

presentes como: polifenóis, ácidos orgânicos (ácido ascórbico), açúcares (por exemplo a frutose) e alguns aminoácidos. Uma alíquota de 500 μL da solução do extrato corretamente diluída foi misturada a 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu a 0,2 M. Após 5 minutos, foram adicionados 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5%. A mistura foi incubada a 25 °C em banho-maria por 1 hora e a absorvância foi medida a 765 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente ao ácido gálico.100 g^{-1} de amostra obtidos de uma curva padrão, que foi construída a partir de uma solução de ácido gálico diluída em concentrações variando de 0-200 mg/L.

3.3.11.3 *Quantificação de flavonoides totais das amostras de chocolate*

A quantificação do conteúdo de flavonoides totais das amostras seguiu a metodologia de Dewanto *et al.* (2002). Uma alíquota de 250 μL da solução do extrato corretamente diluída foi misturada com 1,25 mL de água deionizada e com 75 μL de solução aquosa de NaNO_2 a 5% (m/v). Após 6 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 150 μL de solução aquosa de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 10% (m/v) e esta mistura foi deixada em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois foram adicionados 500 μL de solução aquosa de NaOH 1 mol/L e 2,5 mL de água deionizada. A solução foi agitada e a absorvância lida em em 510 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina por grama de chocolate (mg EC g^{-1} chocolate).

3.3.11.4 *Capacidade sequestradora do radical DPPH das amostras de chocolate*

Foi realizada de acordo com o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), de modo a avaliar a capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical DPPH•. Primeiramente uma alíquota de 100 μL da solução do extrato foi diluída e misturada a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 60 μM (ajustado para abs de 0,9 e 1,0). A mistura foi então agitada e incubada a 25 °C por 30 minutos em ausência de luz. O decréscimo da absorvância foi medido a 517 nm. A análise foi realizada em triplicata para todas as amostras e o valor apresentado como a média (\pm DP). Uma solução de Trolox foi usada como curva padrão (0,5 – 2,0 mM). Os resultados foram expressos como mmol equivalente de Trolox (TEAC, mmol/1 Trolox).

3.3.11.5 Capacidade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS das amostras de chocolate

A capacidade de sequestro do radical ABTS•+ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizada conforme Re *et al.* (1999) com adaptações. O radical ABTS•+ foi gerado por uma reação do ABTS em solução aquosa a 7 mM/L com K₂S₂O₈ a 2,45 mM/L. A mistura foi de 1:1 (v/v) das soluções que foram agitadas e ficaram de repouso variando de 12 a 16 horas, ao abrigo da luz (escuro) em temperatura ambiente (30 °C), sendo ajustado a absorvância de 734 nm para 0,700 de etanol. Desta forma, o extrato foi diluído até ocorrer uma inibição entre 20-80% em relação ao branco. Então, 15 µL da solução da amostra foi misturada com 1,485 mL da solução de ABTS^{□+} previamente preparada, a mistura foi agitada e permaneceu em repouso por 1 minuto no escuro. Passado este tempo a absorvância foi imediatamente medida a 734 nm e isso ocorreu a cada 5 minutos até fechar um total de 40 minutos. A análise foi realizada em triplicata para todas as amostras e o valor apresentado como a média (± DP). Uma solução de Trolox foi usada como curva padrão. Os resultados foram expressos como mmol equivalente de Trolox (TEAC, mmol/1 Trolox).

3.3.11.6 Potencial antioxidante redutor férrico FRAP das amostras de chocolate

A habilidade de redução de ferro das amostras foi determinada de acordo com o método proposto por Benzie; Strain (1996), adaptado por Arnous; Makris; Kefalas (2002). Para cada diluição da amostra, uma alíquota de 100 µL de amostra foi misturada a 100 µL de solução de cloreto férrico 3 mmol/L (preparado em ácido cítrico mmol/L). A mistura foi mantida em banho a 37 °C (± 1) durante 30 minutos. Então 1,800 µL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mol/L foi adicionado e a mistura mantida a a 25 °C por mais 10 minutos, no escuro. A absorvância das amostras foi determinada em 620 nm. Os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox (TEAC, mmol/1 Trolox).

3.3.12 Análise sensorial das amostras de chocolate

O projeto de pesquisa com aplicação de análise sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC sob o número de parecer 5.185.429, CAAE 49717421.9.0000.0121, número do parecer 5.185.429. A participação dos voluntários na pesquisa ocorreu mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – ANEXO 1.

Foi realizada a aceitação sensorial de três amostras de chocolate de cada matriz estudada (ao leite e 70% cacau). Para cada matriz, foram testadas as cepas *Lcb. casei* e *B. subtilis*, que apresentaram os melhores resultados de viabilidade nos estudos realizados previamente, e uma amostra pura, sem adição de cepa (controle), para comparação. Para tanto, foram recrutados 60 consumidores de chocolate que fizeram a avaliação em duas sessões, uma sessão para cada matriz de chocolate. Trinta consumidores avaliaram as amostras da matriz ao leite na primeira sessão e, o restante, as amostras da matriz de chocolate 70% para evitar erros de tendência. Entre uma sessão e outra, foi dado um intervalo de, aproximadamente, 5 minutos. Em cada sessão as amostras foram servidas de forma balanceada, aleatória e simultânea e juntamente com um copo de água para que os consumidores pudessem limpar suas papilas gustativas entre as avaliações. As amostras (aproximadamente 5 g), foram apresentadas em copos plásticos, descartáveis e codificados com três dígitos aleatórios.

A avaliação foi realizada utilizando a escala hedônica de nove pontos, variando de “desgostei extremamente” (nota 1) a “gostei extremamente (nota 9) para que os participantes pudessem expressar sua aceitação com relação ao sabor, à textura e impressão global. Antes de iniciar a análise sensorial, os participantes foram instruídos a preencher um questionário (ANEXO 2) para obtenção do perfil dos avaliadores e de seu hábito de consumo de chocolate.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS APÓS PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO

Para a avaliação da resistência dos microrganismos ao processo de microencapsulação, as células viáveis foram enumeradas antes e após o processo, conforme mostra a Tabela 10.

Tabela 10- Viabilidade das cepas pré e pós microencapsulação.

Amostra	log UFC/g
LP-L	10,02±0,05 ^c
LP-ME	9,96±0,02 ^c
LC-L	11,00±0,03 ^a
LC-ME	10,98±0,05 ^a
BS-L	10,72±0,05 ^b
BS-ME	9,93±0,03 ^c

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna, pelo teste de Tukey ($p>0,05$). LP: *Lpb. plantarum*; LC: *Lcb. casei*; BS: *B. subtilis*; L: cepa livre; ME: cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

De acordo com a Tabela 10, antes da microencapsulação por geleificação iônica, as amostras contendo o *Lcb. casei* foram as que apresentaram melhor viabilidade, sendo estatisticamente igual ($p>0,05$) as amostras do microrganismo microencapsulado (LC-ME). A partir destes dados, é possível inferir que o processo de microencapsulação do *Lcb. casei* não promoveu uma diminuição de viabilidade, indicando que a técnica empregada é eficaz ao preservar o número de células viáveis. O mesmo pode ser observado para o *Lpb. plantarum* livre (LP-L) e *Lpb. plantarum* microencapsulado (LP-ME). Chun; Kim; Cho (2014) também observaram uma diminuição sem significância na viabilidade de *Lpb. plantarum* comercial microencapsulado por meio da técnica de geleificação iônica quando comparado a sua forma livre, indicando que a técnica empregada no estudo foi considerada adequada para o encapsulamento desta espécie.

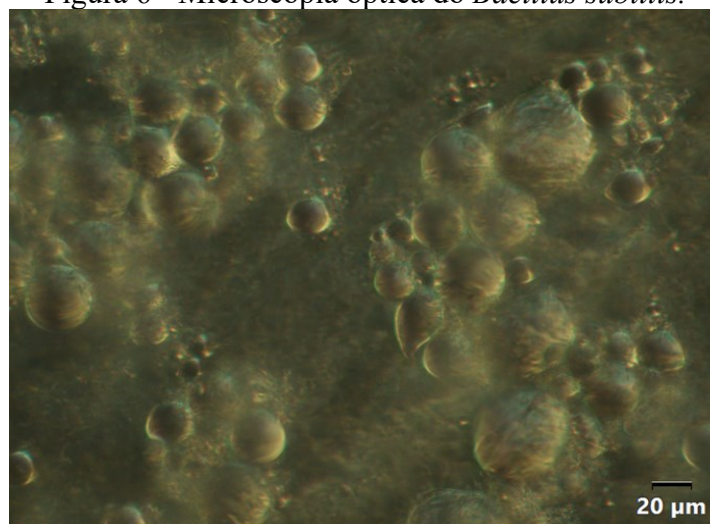
Em contrapartida, o processo de microencapsulamento do *B. subtilis* (BS-ME) resultou em uma perda na viabilidade quando comparado a sua forma livre (BS-L). Este resultado se assemelha ao que foi obtido por Bregni *et al.* (2000), ao realizarem o processo de microencapsulação de *B. subtilis* utilizando alginato de sódio. Os autores observaram que o tempo de multiplicação das células encapsuladas foi significativamente maior do que o das

células não encapsuladas, dando indícios de uma proteção alcançada pelo processo de encapsulação. É comum o microrganismo ser submetido a condições deletérias durante este processo, como, por exemplo, o estresse mecânico pela utilização de agitadores mecânicos durante a produção das micropartículas, ocasionando a redução das contagens das populações de probióticos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS PROBIÓTICAS

Dentre os parâmetros de caracterização a serem controlados durante o processo de microencapsulação de probióticos para aplicação em produtos nutracêuticos, destaca-se as propriedades de morfologia, tamanho, superfície e físico-químicas, na medida em que essas características são capazes de afetar sua estabilidade e propriedades funcionais dos sistemas de distribuição (REQUE; BRANDELLI, 2021). Além disso, a verificação do diâmetro das micropartículas é essencial para selecionar sua aplicação em alimentos, porque esse parâmetro pode causar alterações sensoriais no produto, o que não é desejável especialmente se a textura do alimento for um atributo diferenciado para o consumidor. Segundo Heurtault *et al.* (2003), vários fatores podem influenciar o tamanho das partículas obtidas, como a composição do lipídio utilizado, o composto que será encapsulado, a proporção dos materiais e os parâmetros de processo. A microscopia óptica das micropartículas pode ser observada nas Figuras 6, 7 e 8. É possível verificar o formato esférico, com contornos definidos, evidenciando que o processo de encapsulação foi eficiente.

Figura 6 - Microscopia óptica do *Bacillus subtilis*.

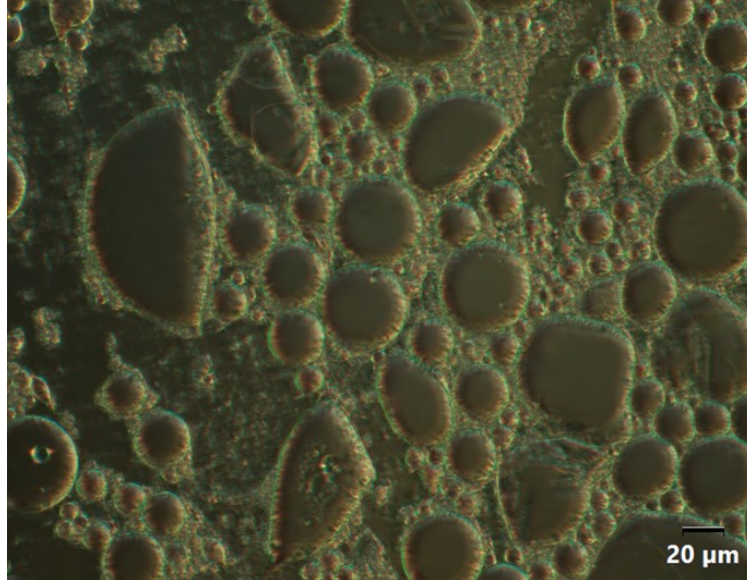


Fonte: Autora (2022).

As imagens obtidas a partir de microscopia óptica com aumento de 40x para as

partículas de *B. subtilis* indicam tamanho aproximado de 10 a 40 μm com forma regular esférica. Partículas maiores foram obtidas Lamas *et al.* (2001) utilizando uma técnica similar de encapsulação do *B. subtilis* em alginato. Os autores constataram por meio da microscopia óptica que as partículas possuíam tamanho entre 50 e 300 μm .

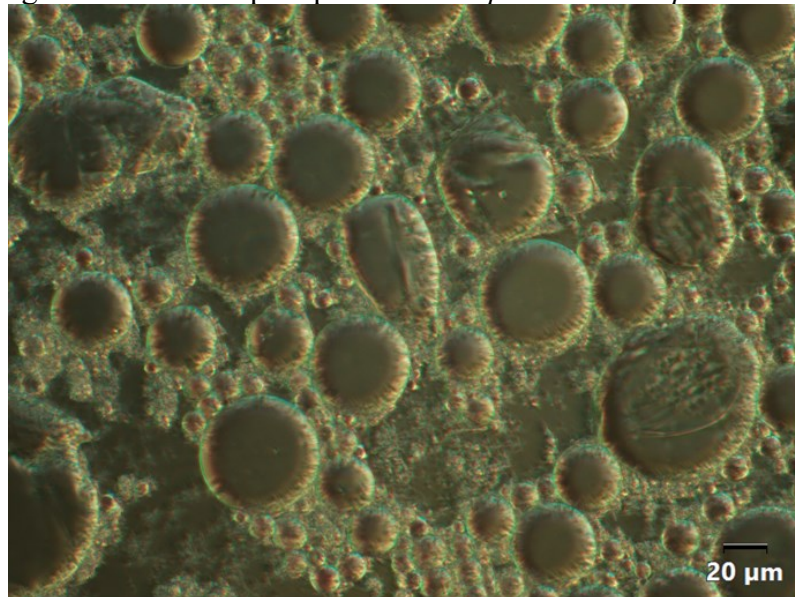
Figura 7 - Microscopia óptica do *Lacticaseibacillus casei*.



Fonte: Autora (2022).

Conforme pode ser observado nas imagens obtidas a partir de microscopia óptica com aumento de 40x, as partículas de *Lcb. casei* apresentam tamanho aproximado de 20 a 50 μm com forma regular que varia de esférica a oval. O tamanho e as características das partículas obtidas dependem diretamente da técnica utilizada para produzi-las e da sua composição. Esta influência pode ser constatada no estudo de Raddatz *et al.* (2022) que avaliaram a viabilidade e a estabilidade de micropartículas probióticas contendo *Lactobacillus casei* LC03 produzidas a partir da geleificação iônica externa, com e sem adição de extrato de cebola vermelha na composição. Os pesquisadores determinaram o tamanho das partículas produzidas por meio da microscopia óptica, constatando um tamanho que variou de 149 a 167 μm .

Figura 8 - Microscopia óptica do *Lactiplantibacillus plantarum*.

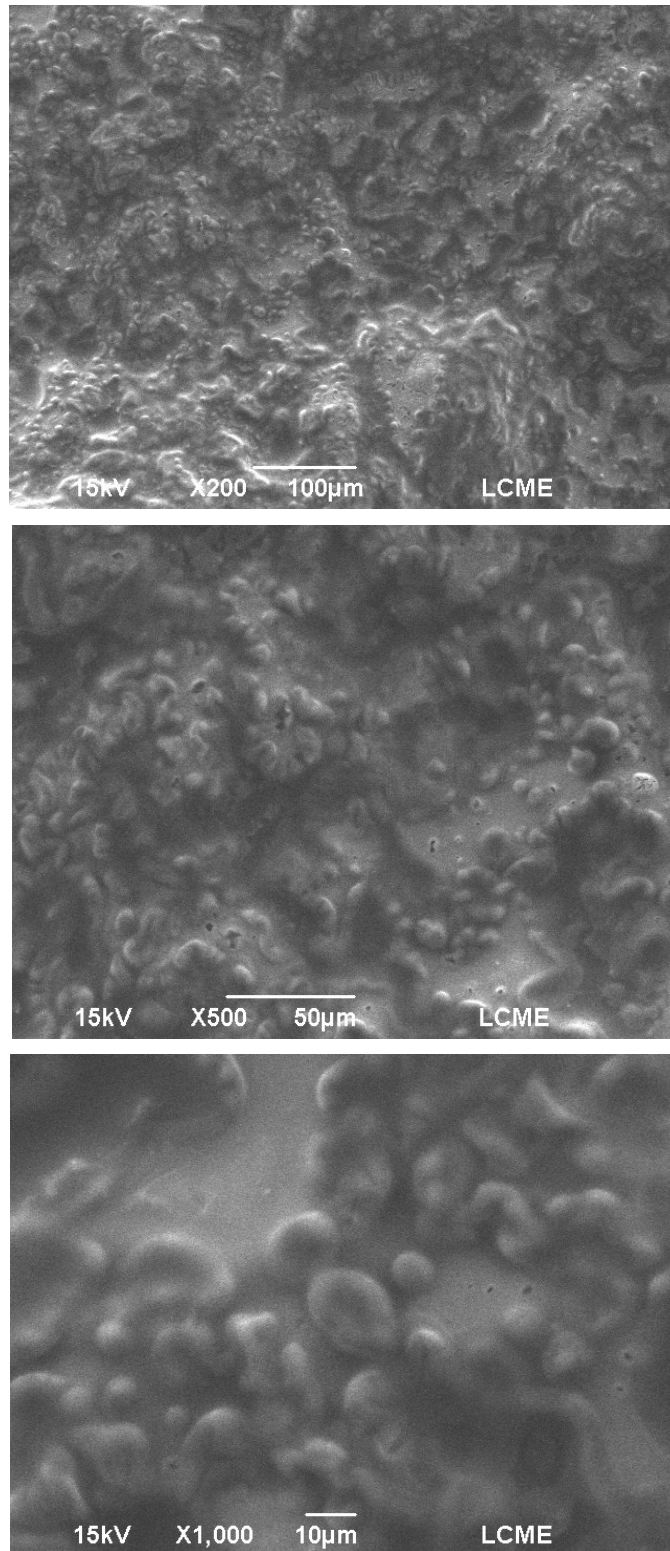


Fonte: Autora (2022).

As imagens obtidas a partir de microscopia óptica com aumento de 40x para as partículas de *Lpb. plantarum* indicam forma regular que varia de esférica a oval e uma baixa polidispersão de tamanho, com resultado aproximado de 20 a 60 µm. Estudos de encapsulação do *Lactobacillus casei* ATCC 39392 realizados por Zanjani *et al.* (2012) por meio da técnica de emulsão utilizando alginato e amido indicam maior polidispersão no tamanho das partículas obtidas, diferente do que foi observado neste trabalho. A morfologia e o tamanho das microcápsulas obtidas pelos pesquisadores foram medidos por microscopia óptica e técnica de microscopia eletrônica de varredura. A análise de microscopia óptica utilizando aumento de 40x constatou que o tamanho das partículas variou de 70 a 500 µm.

As imagens captadas pelo MEV das micropartículas estão ilustradas nas Figuras 9, 10 e 11. As micropartículas apresentaram formato esférico e oval, com diâmetros variáveis (entre 5 e 70 µm), superfície predominantemente lisa, além disso, foi verificado em alguns pontos da micrografia que as micropartículas estavam aglomeradas. As imagens obtidas pelo MEV também revelaram a ausência de microrganismos livres.

Figura 9 - *Bacillus subtilis* microencapsulado. Aumentos de 200, 500 e 100 vezes



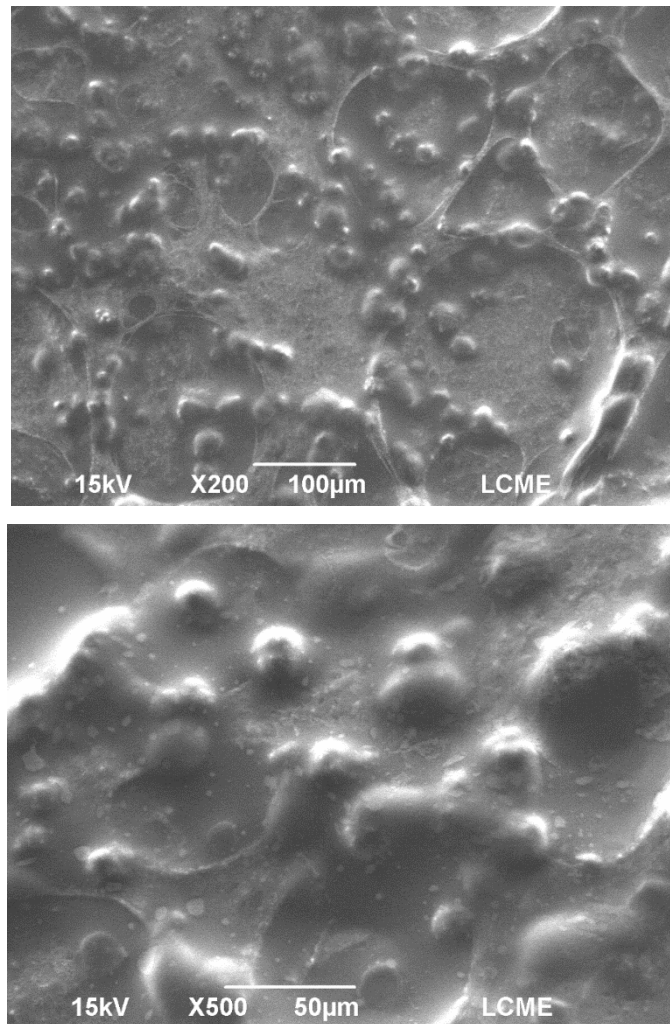
Fonte: Autora (2022).

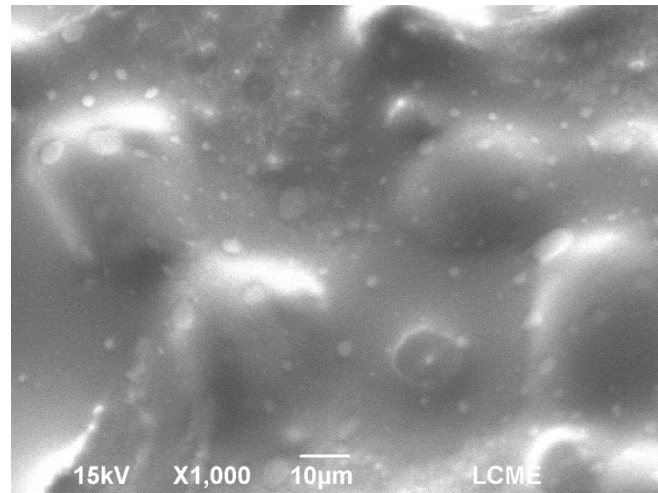
As micropartículas de *B. subtilis* apresentaram tamanho médio aproximado entre 10 e 30 µm, com formato predominantemente oval e pouco porosa. Vale ressaltar que as características das micropartículas dependem diretamente da técnica utilizada, do material que

compõe a cápsula e do substrato que está sendo encapsulado. Um exemplo disso pode ser constatado no estudo de Lamas *et al.* (2001), que produziram esferas compostas de alginato contendo *B. subtilis* microencapsulado. Apesar da similaridade com o que foi desenvolvido no presente trabalho, o tamanho das esferas obtidas por Lamas *et al.* (2001) variou entre 50 a 300 μm , com rugosidade superficial constatada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura.

As imagens captadas pelo MEV das micropartículas de *Lcb. casei* estão ilustradas na Figura 10.

Figura 10 – *Lacticaseibacillus casei* microencapsulado. Aumentos de 200, 500 e 100 vezes.



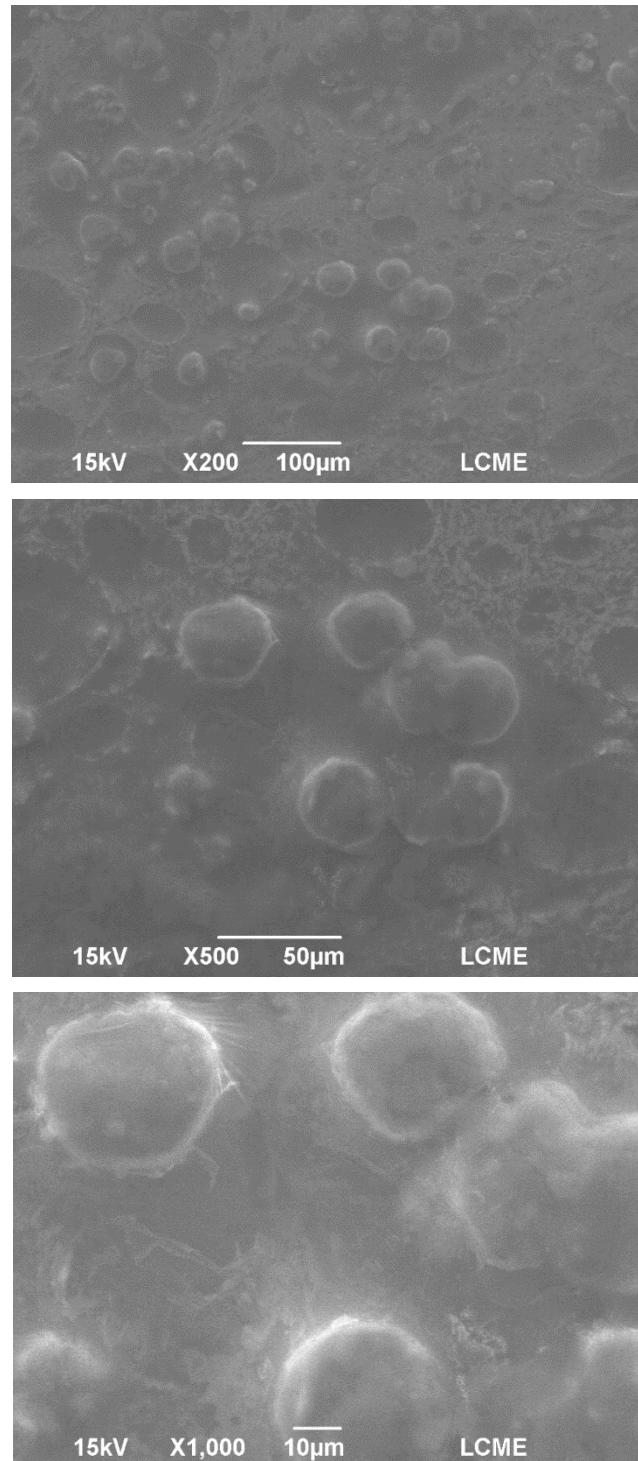


Fonte: Autora (2022).

As micropartículas de *Lcb. casei* apresentaram tamanho médio aproximado entre 20 e 50 μm , com formato predominantemente oval e pouco porosa. Conforme destacado anteriormente, o processo de encapsulação impacta diretamente no tamanho e na morfologia das partículas obtidas. Poletto *et al.* (2019) realizaram a encapsulação do *Ltb. acidophilus* em micropartículas de alginato obtidas por gelificação seguida de liofilização e a análise de microscopia eletrônica de varredura constatou que o tamanho das partículas obtidas variou de 127,5 μm a 234,6 μm . Na mesma direção, Li *et al.* (2019) realizaram a encapsulação por meio da liofilização do *Lcb. casei* e avaliaram diferentes componentes de cápsulas e o impacto das características das microcápsulas obtidas. além dos impactos nos tamanhos das partículas, que variou de 1 a 1700 nm, também observaram variações na morfologia com o auxílio do MEV. Os autores constataram agregação de partículas, o que pode estar relacionado a presença de carbonilas na estrutura de alguns componentes de cápsula utilizados.

As imagens captadas pelo MEV das micropartículas de *Lpb. plantarum* estão ilustradas na Figura 11.

Figura 11- *Lactiplantibacillus plantarum* microencapsulado. Aumentos de 200, 500 e 1000 vezes.



Fonte: Autora (2022).

As micropartículas de *Lpb. plantarum* apresentaram tamanho médio aproximado entre 30 e 40 µm, com formato predominantemente esférico e pouco porosa. Estas características se assemelham aos observados no estudo de sobrevivência e efeito probiótico do *Lpb. plantarum* LS5 livre e encapsulado em alginato realizados por Hashemi *et al.* (2015) e aplicados em uma

bebida típica iraniana à base de leite fermentado. Os pesquisadores avaliaram o tamanho e a morfologia superficial das microcápsulas produzidas por meio das técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, constatando tamanho médio de 20 µm, com formato esférico e aspecto poroso.

A avaliação das características estruturais das partículas probióticas mostrou-se satisfatória e por este motivo fez-se necessário o estudo de viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem, com o objetivo de garantir a robustez das partículas produzidas durante o seu *shelf life*.

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS LIVRES E ENCAPSULADOS DURANTE A ESTOCAGEM

O presente trabalho avaliou a estocagem das micropartículas produzidas na condição de temperatura refrigerada (5 °C) e a temperatura ambiente (23 °C), sem uso de atmosfera modificada ou vácuo. A aplicação das duas temperaturas permitiu simular as condições reais de estocagem de diversos alimentos, pois as micropartículas foram produzidas com essa finalidade de aplicação. A Tabela 10 apresenta a viabilidade dos microrganismos livres, microencapsulados e microencapsulados refrigerado durante *shelf life* de 90 dias.

Tabela 10 - Viabilidade em log UFC/g dos microrganismos livres e microencapsulados em temperatura ambiente (23 °C) e refrigerada (5 °C) durante o *shelf life* de 90 dias.

Amostra	T0	T15	T30	T60	T90
LP-L	10,02±0,05 ^{cA}	2,97±0,02 ^{fB}	<2,00±0,00 ^{gC}	<2,00±0,00 ^{dD}	<2,00±0,00 ^{dD}
LP-ME	9,96±0,02 ^{cA}	9,00±0,03 ^{eB}	8,37±0,04 ^{eC}	7,87±0,02 ^{cD}	7,35±0,05 ^{eE}
LP-MEG	9,96±0,02 ^{cA}	9,95±0,00 ^{cA}	9,70±0,05 ^{cB}	9,28±0,03 ^{aC}	7,46±0,04 ^{cD}
LC-L	11,00±0,03 ^{aA}	3,08±0,10 ^{fB}	<2,00±0,00 ^{gC}	<2,00±0,00 ^{dD}	<2,00±0,00 ^{dD}
LC-ME	10,98±0,05 ^{aA}	9,91±0,02 ^{cB}	8,04±0,04 ^{fC}	7,76±0,08 ^{cD}	7,64±0,05 ^{bD}
LC-MEG	10,98±0,05 ^{aA}	10,36±0,04 ^{aB}	9,97±0,02 ^{aC}	9,00±0,03 ^{bD}	7,59±0,02 ^{bE}
BS-L	10,72±0,05 ^{bA}	10,18±0,04 ^{bB}	9,96±0,01 ^{aC}	9,28±0,03 ^{aD}	8,91±0,03 ^{aE}
BS-ME	9,93±0,03 ^{cA}	9,44±0,04 ^{dB}	9,40±0,04 ^{dBC}	9,33±0,05 ^{aC}	8,84±0,01 ^{aD}
BS-MEG	9,93±0,03 ^{cA}	9,86±0,03 ^{cAB}	9,82±0,04 ^{cB}	9,37±0,03 ^{aC}	8,85±0,03 ^{aCD}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). LP - *Lpb. plantarum*; LC - *Lcb. casei*; BS - *B. subtilis*. L - cepa livre; ME - cepa microencapsulada; MEG - cepa microencapsulada refrigerada.

Fonte: Autora (2022).

A viabilidade do *Lpb. plantarum* microencapsulado foi avaliada durante o período de estocagem em condições de temperatura a 5 °C (refrigeração) e 23 °C (temperatura ambiente), permitindo um comparativo com a viabilidade em sua forma livre. Conforme pode ser observado na Tabela 10, quando o *Lpb. plantarum* está em sua forma livre, há um decréscimo na contagem de células viáveis, indo de 10 log UFC/g no T0 para <2 log UFC/g a partir do T30. Em contrapartida, nas mesmas condições de temperatura, o *Lpb. plantarum* microencapsulado apresentou viabilidade de 7 log UFC/g após os 90 dias de *shelf life*, tendo diminuição de apenas 2 log UFC/g quando comparado ao T0. O mesmo pode ser observado quando se avalia os resultados de viabilidade para o *Lpb. plantarum* microencapsulado acondicionado sob refrigeração de 5 °C. Resultados similares foram obtidos por Mahmoud *et al.* (2020) ao avaliarem a viabilidade de *Lpb. plantarum* encapsulado usando material à base de alginato combinado com diferentes biopolímeros. Os pesquisadores identificaram que o *Lpb. plantarum* apresentou excelente viabilidade após 4 semanas de estocagem a temperatura aproximada de 6 °C, em alguns casos até sendo superior a contagem observada no T0. Vale ressaltar que a similaridade entre a contagem celular obtida para o *Lpb. plantarum* em 5 °C e 25 °C evidencia que, além de manter os níveis de viabilidade necessárias para posterior aplicação em alimento probiótico durante todo o estudo de *shelf life*, o insumo produzido no presente trabalho tem versatilidade no que diz respeito a condições de armazenagem.

De acordo com a Tabela 10, no tempo inicial (T0) as amostras de *Lcb. casei* livre (LC-L), microencapsulado (LC-ME) e microencapsulado refrigerado (LC-MEG) não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). No entanto, LC-L a partir de 30 dias de armazenamento atingiu valores abaixo do nível de detecção (<2,00 log UFC/g), enquanto LC-ME resultou em uma redução de 3,34 log UFC/g em 90 dias de *shelf life*. O mesmo pode ser observado quando se avalia os resultados de viabilidade para LC-MEG. A microencapsulação do *Lcb. casei*, manteve sua viabilidade superior a 7,50 log UFC/g em 90 dias de *shelf life*, tanto em condições de temperatura ambiente, quanto em temperatura refrigerada, garantindo versatilidade no que diz respeito a condições de armazenagem do insumo produzido.

O aumento na viabilidade celular após a microencapsulação também foi constatado por Yoo *et al.* (1996), que utilizaram três fórmulas contendo alginato para microencapsular *Lcb. casei*, dentre elas a formulação contendo alginato de cálcio. Apesar de não apresentar o melhor resultado comparado com as outras formulações estudadas quando em meio ácido, houve um acréscimo na viabilidade celular. Mandal; Puniya; Singh (2006) também identificaram proteção significativa às células após a encapsulação com alginato de cálcio a concentração de 4%,

garantindo que a viabilidade do *Lcb. casei* NCDC-298 tivesse um decréscimo de apenas 2 log UFC/g após 3 horas de exposição em pH igual a 1,5.

A viabilidade do *B. subtilis* encapsulado foi avaliada durante o período de estocagem em condições de temperatura a 5 °C e 23°C, permitindo um comparativo com a viabilidade em sua forma livre. Conforme pode ser observado na Tabela 10, quando está em sua forma livre (BS-L), o *B. subtilis* apresenta viabilidade celular inicial maior ao ser comparado a forma encapsulada (BS-ME e BS-MEG), mas há um decréscimo de 2 log na contagem de células viáveis, indo de 10,0 a 8,0 log UFC/g nos tempos 0 e 90 dias de *shelf life*, respectivamente. Ao ser encapsulado, o *B. subtilis* apresenta viabilidade inicial de 9,0 log UFC/g, tendo perda de apenas 1,0 log UFC/g após os 90 dias de *shelf life*.

De modo geral, os resultados referentes as três espécies estudadas são promissoras no que se refere a viabilidade após a encapsulação, especialmente devido à baixa influência da temperatura de armazenagem, garantindo maior versatilidade ao insumo produzido.

4.4 ATIVIDADE DE ÁGUA (AW) E PH DOS CHOCOLATES PROBIOTICOS DURANTE A ESTOCAGEM

A Tabela 11 apresenta a aw das amostras de chocolate, inicial e após a estocagem dos produtos a temperatura ambiente por 90 dias. Todas as formulações de chocolate apresentaram aumento da aw no decorrer dos 90 dias de estocagem, inclusive as amostras controle, sem adição das cepas. A etapa de temperagem dos chocolates de alguma forma pode ter aumentado a higroscopia das amostras. Apesar disto, todas as formulações apresentarem valores de atividade de água abaixo de 0,6, o que contribui para a segurança microbiológica do chocolate (SILVA, 2016). A amostra controle, quando comparada as amostras de chocolate adicionadas de probióticos, apresentou aw inferior, pois nas amostras de chocolate inoculadas foram utilizadas células bacterianas obtidas de uma suspensão aquosa.

Tabela 11- Valores para atividade de água (aw) das amostras de chocolate estocadas a temperatura ambiente por 90 dias.

Amostra	T0	T90
LP-CLL	0,41±0,007 ^{bcdB}	0,46±0,003 ^{fgA}
LP-C70L	0,43±0,007 ^{bB}	0,48±0,001 ^{eA}
LP-CLME	0,53±0,007 ^{aB}	0,56±0,004 ^{aA}
LP-C70ME	0,51±0,004 ^{aB}	0,56±0,005 ^{aA}
LC-CLL	0,37±0,029 ^{eB}	0,43±0,002 ^{hA}
LC-C70L	0,50±0,004 ^{aA}	0,47±0,008 ^{efB}
LC-CLME	0,51±0,005 ^{aB}	0,54±0,005 ^{bcA}
LC-C70ME	0,52±0,006 ^{aB}	0,55±0,005 ^{abA}
BS-CLL	0,37±0,001 ^{eB}	0,43±0,004 ^{hA}
BS-C70L	0,40±0,001 ^{cdeB}	0,45±0,001 ^{gA}
BS-CLME	0,51±0,008 ^{aB}	0,54±0,006 ^{bcA}
BS-C70ME	0,50±0,01 ^{aB}	0,54±0,001 ^{dA}
CL	0,39±0,001 ^{deB}	0,42±0,003 ^{hA}
C70	0,43±0,002 ^{bcB}	0,47±0,005 ^{eA}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p>0,05$). **LP** - *Lpb. plantarum*; **LC** - *Lcb. casei*; **BS** - *B. subtilis*; **CL** - chocolate ao leite; **C70** - chocolate 70%; **L** - cepa livre; **ME** - cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

Outro parâmetro avaliado no presente estudo foi o pH das amostras de chocolate avaliadas no tempo 0 e após 90 dias de *shelf life* a temperatura ambiente (Tabela 12) demonstrando que as cepas potencialmente probióticas, não alteraram significativamente ($p<0,05$) o pH dos chocolates. Silva (2016) e Succi *et al.* (2017) também realizaram o acompanhamento do pH de amostras de chocolate meio amargo e amargo, adicionadas de cepas do gênero *Lactobacillus*, não verificando alterações significativas durante armazenamento. Em relação ao gênero *Bacillus*, um estudo realizado com o *B. coagulans*, por Kobus-Cisowska *et al.* (2019), fez o acompanhamento do pH durante 24 meses, não apresentando variações significativas durante o período de armazenamento.

Tabela 12- Valores de pH das amostras de chocolate acondicionadas temperatura ambiente por 90 dias.

Amostras	T0	T90
LP-CLL	6,00±0,01 ^{bA}	5,96±0,01 ^{bB}
LP-C70L	5,38±0,01 ^{cdA}	5,35±0,03 ^{cdA}
LP-CLME	6,15±0,02 ^{aA}	6,12±0,01 ^{aA}
LP-C70ME	5,38±0,03 ^{bA}	5,35±0,01 ^{cdA}
LC-CLL	6,09±0,02 ^{abA}	6,08±0,02 ^{aA}
LC-C70L	5,34±0,06 ^{cdA}	5,27±0,04 ^{deA}
LC-CLME	6,02±0,01 ^{bA}	5,97±0,01 ^{bB}
LC-C70ME	5,30±0,01 ^{cdA}	5,22±0,02 ^{eA}
BS-CLL	6,10±0,00 ^{abA}	6,07±0,01 ^{aA}
BS-C70L	5,39±0,02 ^{cA}	5,37 ±0,02 ^{cA}
BS-CLME	6,10±0,05 ^{abA}	6,13±0,02 ^{aA}
BS-C70ME	5,26±0,03 ^{dA}	5,22±0,03 ^{eA}
CL	6,10±0,02 ^{abA}	6,10±0,03 ^{aA}
C70	5,36±0,09 ^{cdA}	5,35±0,07 ^{cdA}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p>0,05$). **LP** - *Lpb. plantarum*; **LC** - *Lcb. casei*; **BS** - *B. subtilis*; **CL** - chocolate ao leite; **C70** - chocolate 70%; **L** - cepa livre; **ME** - cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

4.5 VIABILIDADE DOS PROBIOTICOS APLICADOS NAS DIFERENTES MATRIZES DE CHOCOLATE DURANTE A ESTOCAGEM

A viabilidade dos probióticos nas amostras de chocolate foi avaliada durante 90 dias de *shel life* em temperatura ambiente.

A Tabela 13 apresenta a viabilidade dos microrganismos livres e microencapsulados incorporados nas matrizes chocolate ao leite e chocolate 70% durante o *shelf life*. Os resultados estão apresentados em log UFC/g.

Tabela 13– Viabilidade celular das cepas potencialmente probióticas aplicadas em chocolate na forma livre e microencapsulada durante 90 dias de *shelf life* a 23 °C

Amostra	T0	T15	T30	T60	T90
LP-CLL	7,84±0,53 ^{gA}	4,57±0,03 ^{eB}	3,26±0,03 ^{Hc}	<2,00±0,00 ^{iD}	<2,00±0,00 ^{fD}
LP-C70L	8,99±0,01 ^{cA}	6,00±0,02 ^{dB}	3,98±0,02 ^{gC}	3,26±0,03 ^{hD}	2,04±0,04 ^{eE}
LP-CLME	8,32±0,04 ^{fA}	5,91±0,04 ^{dB}	3,11±0,54 ^{hC}	<2,00±0,00 ^{iD}	<2,00±0,00 ^{fD}
LP-C70ME	9,47±0,02 ^{bA}	5,97±0,02 ^{dB}	4,97±0,03 ^{fC}	4,46±0,04 ^{fD}	2,01±0,02 ^{eE}
LC-CLL	8,72±0,03 ^{eA}	8,60±0,04 ^{bB}	8,47±0,02 ^{cbC}	7,92±0,04 ^{cdD}	6,44±0,03 ^{bE}
LC-C70L	8,85±0,04 ^{dA}	8,41±0,04 ^{cbB}	7,87±0,03 ^{ecC}	6,88±0,08 ^{dD}	5,92±0,02 ^{ceE}
LC-CLME	8,97±0,02 ^{cA}	8,46±0,01 ^{cbB}	7,96±0,02 ^{edC}	4,01±0,06 ^{gD}	<2,00±0,00 ^{fE}
LC-C70ME	9,02±0,04 ^{cA}	8,60±0,03 ^{bA}	7,92±0,03 ^{ebB}	5,51±0,14 ^{ecC}	3,91±0,49 ^{dD}
BS-CLL	8,98±0,04 ^{cA}	8,66±0,05 ^{bB}	8,42±0,02 ^{cdC}	8,39±0,03 ^{bcC}	8,36±0,03 ^{aC}
BS-C70L	9,96±0,04 ^{aA}	8,53±0,07 ^{bcB}	8,51±0,02 ^{cbaB}	8,47±0,02 ^{bbB}	8,45±0,02 ^{abB}
BS-CLME	9,50±0,02 ^{bA}	8,97±0,03 ^{abB}	8,92±0,02 ^{baB}	8,70±0,05 ^{aC}	8,70±0,02 ^{aC}
BS-C70ME	8,98±0,05 ^{cA}	8,98±0,02 ^{aA}	8,95±0,02 ^{aA}	8,66±0,02 ^{aB}	8,65±0,04 ^{aB}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p>0,05$). LP - *Lpb. plantarum*; LC - *Lcb. casei*; BS - *B. subtilis*; CL - chocolate ao leite; C70 - chocolate 70%; L - cepa livre; ME - cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

De acordo com os dados dispostos na Tabela 13, é possível observar um decréscimo na viabilidade do *Lpb. plantarum* livre (LP-CLL) e microencapsulado (LP-CLME) quando aplicado na matriz chocolate ao leite, não sendo constatado contagem significativa a partir de 60 dias de *shelf life*. Em contrapartida, ainda foi possível constatar viabilidade para o *Lpb. plantarum* livre (LP-C70L) e microencapsulado (LP-C70ME) quando aplicados na matriz chocolate 70% após 60 dias de *shelf life*, este comportamento pode ser explicado devido uma possível proteção da própria matriz ao microrganismo. Apesar dos resultados de viabilidade para o *Lpb. plantarum* nas matrizes selecionadas não serem tão interessantes do ponto de vista comercial, não está descartada a possibilidade de aplicação desta espécie microencapsulada em outras matrizes, uma vez que os resultados obtidos e discutidos no tópico 5.3 deste trabalho indicam que a microencapsulação conferiu maior viabilidade, sendo apenas necessário testar o produto na potencial matriz a ser aplicado. Esta observação está suportada pelos estudos realizados por Mirković *et al.* (2018) que demonstraram que as bactérias probióticas de *Lpb. plantarum* encapsuladas e secas apresentaram uma viabilidade interessante em chocolate com alto teor de cacau durante o período de armazenamento de 180 dias a 20 °C. Além disso, é evidente que, com a expansão do mercado de alimentos probióticos, a busca por novos produtos probióticos estimula a investigação do comportamento dos microrganismos nas mais variadas matrizes. Nesta direção, Shoaie *et al.* (2022) avaliaram a sobrevivência do *Lpb. plantarum* microencapsulado e aplicado em uma geleia de pétalas de rosa, produto muito consumido no Irã e na Índia. Os autores observaram que a microencapsulação da espécie em cápsulas

compostas de alginato e goma arábica resultaram em um incremento na viabilidade quando comparada a sua forma livre.

Os estudos de viabilidade dos probióticos na matriz chocolate foram conduzidos com *Lcb. casei* na sua forma livre (LC-CLL e LC-C70L) e microencapsulada (LC-CLME e LC-C70ME). De acordo com os resultados obtidos, é possível constatar que a espécie em sua forma livre apresentou viabilidade significativa decorridos os 90 dias de *shelf life* no chocolate ao leite e no chocolate 70% cacau, expressando uma contagem de células viáveis de 6,44 e 5,92 log, respectivamente. Este resultado está em concordância com o obtido por Nebesny *et al.* (2007) que, ao produzirem amostras de chocolate amargo probiótico com *Lcb. casei* e *Lacticaseibacillus paracasei*, observaram viabilidade entre 6-7 log UFC/g para as amostras armazenadas nas temperaturas de 18 e 4 °C por um período de 12 meses.

Em contrapartida, os resultados de viabilidade para *Lcb. casei* em sua forma microencapsulada aplicada em chocolate ao leite e chocolate 70% indicam um decréscimo significativo na contagem de células viáveis em 90 dias de *shelf life*, sendo que no chocolate ao leite não houve detecção do microrganismo, enquanto para o chocolate 70% a contagem foi de 3,91 log UFC/g ao final do mesmo período. De maneira similar, Mandal *et al.* (2013) microencapsularam *Lcb. casei* NCDC 298 utilizando alginato de sódio, em seguida as partículas probióticas foram adicionadas em chocolate ao leite, e como amostra controle foi adicionada a mesma cepa não encapsulada no chocolate. Durante a estocagem dos produtos a 7 °C por 60 dias, foi verificado que a microencapsulação não prolongou a viabilidade dos probióticos, comparado ao tratamento controle. Esses resultados são similares ao presente trabalho, que verificou que a microencapsulação não prolongou a viabilidade das células quando aplicados em chocolate.

Kemsawasd; Chaikham; Rattanasena (2016) desenvolveram amostras de chocolate amargo, ao leite e branco adicionados de probióticos encapsulados por spray drying. Os autores estudaram a viabilidade de probióticos *Lcb. casei* 01 e *Ltb. acidophilus* LA5 durante o armazenamento das amostras de chocolate. Ambas as culturas apresentaram viabilidade > 6,0 log UFC/g até 60 dias de armazenamento quando armazenadas sob refrigeração de 4 °C, tendo decaimento de apenas 2,0 log UFC/g quando comparado ao tempo inicial. Em contrapartida, a viabilidade foi comprometida a partir de 40 dias de estocagem a 25 °C tendo decaimento de 6,0 log UFC/g em comparação com a viabilidade inicial, sendo similares aos resultados observados no presente estudo.

A menor redução de viabilidade do estudo ocorreu com o probiótico *B. subtilis* presentes do chocolate ao leite e chocolate 70%, tanto no seu formato livre quanto

microencapsulado. Ao final dos 90 dias de estocagem, ele apresentou a melhor viabilidade do estudo, em relação aos outros microrganismos testados, com contagem superior a 8,3 log UFC/g. Estes resultados eram esperados devido ao fato de que endósporos bacterianos foram usados para este microrganismo no estudo. Os esporos possuem grande resistência podendo sobreviver a condições extremas de temperatura, por exemplo. Esta capacidade foi observada por Permpoonpattana *et al.* (2012) que constataram que os esporos de *B. subtilis* aplicados em biscoitos integrais são capazes de sobreviver a temperatura de 235 °C por 8 minutos com redução de apenas 1,0 log UFC/g de viabilidade. Isto torna o microrganismo de interessante para aplicação em produtos probióticos devido a sua possível resistência a processos produtivos. Kobus-Cisowska *et al.* (2019) desenvolveram um chocolate probiótico com *B. coagulans*, avaliando os aspectos sensoriais, os índices de polifenóis e a bioacessibilidade. Os autores constataram alta taxa de sobrevivência dos *Bacillus* no chocolate durante o armazenamento. O chocolate contendo o probiótico liofilizado apresentou viabilidade entre 7-8,0 log UFC/g ao longo de 24 meses de estocagem a 18 °C.

4.6 AVALIAÇÃO DA RESISTENCIA DOS MICROORGANISMOS APLICADOS EM CHOCOLATE DURANTE A SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL

Matrizes alimentares podem conferir adicional proteção aos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Conforme pode ser observado na Tabela 14, os resultados obtidos na simulação de passagem pelo TGI para os probióticos livres e microencapsulados preparados em base chocolate expressam dados promissores, uma vez que a viabilidade para ambas as espécies foi mantida em níveis adequados nas etapas oral, gástrica e intestinal, tanto em condição livre quanto microencapsulada.

Tabela 14 - Viabilidade em log UFC/g dos microrganismos livres e microencapsulados em base chocolate na simulação de passagem pelo trato-gastrointestinal (TGI).

Amostra	Inicial	TGI – Oral	TGI – Gástrica	TGI – Intestinal
LC-CLL	9,65±0,02 ^{aA}	9,29±0,13 ^{aB}	9,10±0,09 ^{aB}	8,80±0,02 ^{aC}
LC-C70L	9,62±0,06 ^{aA}	8,99±0,04 ^{bcB}	8,28±0,06 ^{bcdC}	8,53±0,43 ^{abBC}
LC-CLME	9,49±0,11 ^{abA}	9,48±0,04 ^{aA}	9,16±0,11 ^{aB}	9,09±0,08 ^{aB}
LC-C70ME	9,31±0,15 ^{bA}	9,25±0,19 ^{abAB}	9,07±0,04 ^{aAB}	8,62±0,44 ^{aB}
BS-CLL	8,65±0,10 ^{cdA}	8,26±0,08 ^{eB}	8,24±0,06 ^{cdB}	8,50±0,17 ^{abAB}
BS-C70L	8,43±0,10 ^{dA}	8,26±0,04 ^{eAB}	8,11±0,13 ^{dBC}	7,96±0,04 ^{bc}
BS-CLME	8,70±0,11 ^{ca}	8,68±0,12 ^{dAB}	8,50±0,03 ^{bAB}	8,47±0,02 ^{abB}
BS-C70ME	8,91±0,04 ^{ca}	8,69±0,12 ^{cdB}	8,42±0,06 ^{bcC}	8,79±0,08 ^{aAB}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p>0,05$). LC – *Lcb. casei*; BS – *B. subtilis*; CL – chocolate ao leite; C70 – chocolate 70%; L – cepa livre; ME – cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

O *Lcb. casei* apresentou viabilidade inicial de pouco mais de 9,0 log UFC/g, tanto em sua forma livre quanto microencapsulada. Ao ser submetido nas condições da fase oral por 1 minuto, o decaimento foi menor que 1,0 log UFC/g. Este mesmo perfil se repetiu na etapa gástrica, quando foi submetido a condição de pH 3,0 por um período de 2 horas e na fase intestinal, ao ser submetido a pH 7,0 por mais 2 horas. A viabilidade inicial do *B. subtilis* foi menor quando comparada a outra espécie avaliada. Entretanto, os resultados obtidos nas etapas oral, gástrica e intestinal são similares, pois houve redução pouco significativa na viabilidade quando comparada a inicial.

Devido à similaridade nos resultados de viabilidade obtidos para a forma livre e microencapsulada para as espécies aplicadas no chocolate, pode-se inferir que a matriz chocolate conferiu certa proteção as bactérias, gerando resistência às condições estressantes as quais foram submetidas. Este resultado se assemelha ao obtido por Marcial-Coba *et al.* (2019) que avaliaram chocolate com altos teores de cacau como matriz para *Akkermansia muciniphila* e *Lcb. casei* microencapsulados. De acordo com os resultados obtidos, os pesquisadores atribuíram a melhoria na viabilidade não apenas ao revestimento da cápsula, mas também à matriz alimentar selecionada, especialmente devido a característica tamponante observada, permitindo uma passagem pelo pH ácido do estômago de forma facilitada.

De acordo com o que é reportado na literatura, o encapsulamento de probióticos no chocolate apresenta-se como uma alternativa muito eficaz em termos de manter sua viabilidade durante a passagem pelo TGI. Silva *et al.* (2017) relataram que a sobrevivência de *Bifidobacterium animalis subsp lactis* e *Ltb. acidophilus* incorporada ao chocolate não foi significativamente afetada após 120 dias de armazenamento a 25 °C e a digestão gastrointestinal *in vitro* de chocolate probiótico não causou nenhuma redução significativa na contagem probiótica. Ambos os casos relatados podem estar relacionados com o grande número de

antioxidantes naturais presentes no chocolate, que podem promover proteção adicional aos probióticos, caracterizando o chocolate como uma excelente matriz, sendo até melhor em comparação aos produtos lácteos (HOSSAIN et al., 2020).

Além disso, a manteiga de cacau foi apontada por apresentar um efeito protetor, possivelmente bloqueando a exposição das bactérias probióticas à água e fatores de estresse como enzimas ácidas, biliares e digestivas (LAHTINEN *et al.*, 2007). O teor de gordura presente na matriz chocolate 70% cacau é de 40%, maior do que no chocolate ao leite (28,8%). No entanto a viabilidade das bactérias probióticas foram ligeiramente maiores no chocolate ao leite, o que pode indicar um efeito sinérgico do teor de gordura e maior teor de proteínas e, assim, a capacidade de tampão no chocolate ao leite proteger melhor as bactérias probióticas contra o baixo pH do estômago, em comparação com 70% de chocolate escuro. Esse fator foi observado e relatado por Klindt-Toldam *et al.* (2016).

Apesar do reconhecido potencial probiótico do *B. subtilis*, não estão disponíveis na literatura estudos envolvendo *B. subtilis* aplicado em matriz chocolate. Kobus-Cisowska *et al.* (2019) desenvolveram um chocolate probiótico com *B. coagulans*, os autores constataram alta taxa de sobrevivência das bactérias contidas no chocolate após passar pelas condições simuladas de digestão do TGI. O chocolate contendo o probiótico liofilizado apresentou viabilidade entre 6,0 e 10,0 log UFC/g ao longo da simulação de digestão gastrointestinal, sendo muito similar aos resultados obtidos no presente trabalho utilizando o *B. subtilis*.

4.7 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATE CONTENDO AS CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS LIVRES E ENCAPSULADAS

4.7.1 Determinação do teor de fenólicos totais

Os compostos fenólicos presentes em alimentos conferem uma série de benefícios à saúde, estando relacionados à capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Essas características estão associadas à capacidade de compostos fenólicos doarem hidrogênio ou elétrons para radicais livres, que estabiliza as membranas celulares, oferece proteção contra processos oxidativos e inibe diferentes citocinas pró-inflamatórias (DE SOUZA et al., 2019). Esses compostos interagem de forma bidirecional com os microrganismos presentes no intestino, pois além de serem biotransformados pela microbiota intestinal, garantindo a absorção e modulação da atividade biológica dos fenólicos, a interação da microbiota intestinal com os compostos

fenólicos também pode potencializar a modulação da população microbiana presente no TGI (DE SOUZA et al., 2019; TOMÁS-BARBERÁN; SELMA; ESPÍN, 2016).

O método de Folin-Ciocalteu (FC) é muito utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais, e acabou se tornando um indicador quando utilizado para a determinação de compostos antioxidantes (RUFINO *et al.*, 2006). Na presença de agentes redutores como os compostos fenólicos, molibdênio e tungstênio, que estão no estado de oxidação 6+, reagem através da transferência de elétrons, e, em meio alcalino, formam um complexo azul. A intensidade dessa cor varia com a quantidade de substâncias redutoras presentes como: polifenóis, ácidos orgânicos (ácido ascórbico), açúcares (por exemplo a frutose) e alguns aminoácidos. Sendo assim, foi realizada a determinação do teor de compostos fenólicos totais (TFT) dos extratos nas etapas da simulação de digestão gastrointestinal utilizando a metodologia descrita por Singleton; Rossi (1965) e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15- Teor de fenólicos total (TFT) das amostras de chocolate nas etapas da simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média \pm desvio padrão) expressos em equivalente de ácido gálico (mg/g).

Amostra	Inicial	TGI - Oral	TGI - gástrica	TGI - Intestinal
LC-CLL	4,790 \pm 0,09 ^{dB}	3,99 \pm 0,04 ^{cC}	1,70 \pm 0,23 ^{eD}	12,95 \pm 0,23 ^{efA}
LC-C70L	25,28 \pm 0,34 ^{aB}	19,07 \pm 0,13 ^{bD}	22,71 \pm 0,52 ^{aC}	43,92 \pm 1,17 ^{aA}
LC-CLME	4,38 \pm 0,04 ^{dB}	4,84 \pm 0,08 ^{cB}	3,20 \pm 0,21 ^{dB}	14,62 \pm 1,64 ^{eA}
LC-C70ME	24,26 \pm 0,36 ^{aB}	24,73 \pm 1,21 ^{aB}	17,08 \pm 0,33 ^{bC}	27,38 \pm 1,02 ^{cdA}
BS-CLL	1,43 \pm 0,05 ^{eC}	2,12 \pm 0,34 ^{dB}	1,26 \pm 0,15 ^{eC}	6,15 \pm 0,10 ^{gA}
BS-C70L	24,32 \pm 0,61 ^{aAB}	19,63 \pm 0,58 ^{bBC}	15,50 \pm 0,42 ^{cC}	27,10 \pm 3,92 ^{dA}
BS-CLME	1,70 \pm 0,04 ^{eBC}	1,99 \pm 0,07 ^{dB}	1,44 \pm 0,11 ^{eC}	9,41 \pm 0,18 ^{fgA}
BS-C70ME	18,45 \pm 0,60 ^{cB}	18,94 \pm 0,22 ^{bB}	15,06 \pm 0,98 ^{cC}	33,80 \pm 0,59 ^{bA}
CL	1,89 \pm 0,03 ^{eB}	1,82 \pm 0,11 ^{dB}	1,21 \pm 0,11 ^{eC}	8,75 \pm 0,11 ^{fgA}
C70	22,39 \pm 1,05 ^{bB}	24,02 \pm 0,76 ^{aB}	23,51 \pm 0,55 ^{aB}	31,39 \pm 0,55 ^{bcA}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). LP - *Lcb. plantarum*; LC - *Lpb. casei*; BS - *B. subtilis*; CL - chocolate ao leite; C70 - chocolate 70%; L - cepa livre; ME - cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

De acordo com os resultados encontrados (Tabela 15), a presença de *Lcb. casei* livre e microencapsulado aumenta o TFT nos chocolates ao leite e 70% no tempo inicial quando comparado com os chocolates sem o probiótico na composição. Avaliando o TFT na etapa oral da simulação gastrointestinal, algumas das formulações apresentam um decréscimo no teor obtido. Esta característica é ainda mais expressiva na etapa gástrica, onde o teor decai consideravelmente, tanto no chocolate com a adição das cepas quanto no chocolate sem.

A bioatividade dos compostos fenólicos é condicionada principalmente por sua bioacessibilidade no TGI (MARTINI; CONTE; TAGLIAZUCCHI, 2018) e por este motivo é oportuno conhecer o seu perfil em todas as etapas de digestão. Durante a avaliação das quantidades de compostos fenólicos de chocolate com altos teores de cacau bioacessíveis após a digestão gastro-intestinal realizada por Martini; Conte; Tagliazucchi (2018), foi observado que ao final da fase salivar, cerca de 8 a 10% dos compostos fenólicos totais foram liberados das matrizes alimentares, quando comparado a extração química. A quantidade de compostos fenólicos totais bioacessíveis aumentou de 20 a 30% após duas horas de digestão gástrica. Neste sentido, mesmo com a diminuição de TFT observada na etapa oral e gastro no presente trabalho, destaca-se a capacidade do TGI em se comportar como um extrator, promovendo a liberação de compostos fenólicos da matriz alimentar.

Ao avaliar os resultados de TFT na etapa intestinal, é possível observar uma tendência amplamente relatada na literatura, que consiste na recuperação dos compostos fenólicos, uma vez que existe uma relação bidirecional entre os microrganismos presentes no intestino e os compostos fenólicos. Isso contribui inclusive para a melhora na viabilidade dos probióticos, pois os compostos fenólicos funcionam como substratos para os microrganismos (DE SOUZA *et al.*, 2019). Alguns estudos relatam que o intestino é o principal responsável pela liberação de fenólicos. O efeito da digestão sobre o teor fenólico e a atividade antioxidante de 33 frutas, para liberação fenólica foi investigado por Chein *et al.* (2015). Cada estágio, especialmente a digestão intestinal, foi responsável aumentar o conteúdo fenólico no fluido de digestão. Nos estudos realizados por Martini; Conte; Tagliazucchi (2018) foi constatado que a quantidade de compostos fenólicos totais bioacessíveis foi de 40 a 60% após toda a etapa de digestão do chocolate com altos teores de cacau, demonstrando mais uma vez a capacidade extratora do TGI e, conseqüentemente, o incremento na bioacessibilidade dos compostos fenólicos ao chegarem ao intestino.

4.7.2 Quantificação de flavonoides totais

Os flavonoides são um grupo de polifenóis que se destacam no ramo dos produtos nutracêuticos devido aos benefícios que trazem para a saúde. No entanto, um dos desafios diz respeito a má biodisponibilidade após a ingestão (GONZALES *et al.*, 2015). Com o objetivo de investigar quantitativamente a presença de flavonoides totais nas amostras de chocolate, realizou-se a quantificação a partir da metodologia de Dewanto *et al.* (2002) e os resultados estão expressos na Tabela 16 em mg equivalente de catequina por grama de chocolate (mg EC

g-1 chocolate).

Tabela 16 - Quantificação de flavonoides totais das amostras de chocolate nas etapas da simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média \pm desvio padrão) expressos em mg equivalente de catequina por grama de chocolate (mg EC g-1 chocolate).

Amostra	Inicial	TGI – Oral	TGI - Gástrico	TGI - Intestinal
LC-CLL	7,54 \pm 0,87 ^{bB}	5,30 \pm 0,84 ^{cC}	4,66 \pm 0,42 ^{cC}	13,62 \pm 1,00 ^{defA}
LC-C70L	13,70 \pm 0,84 ^{aB}	13,06 \pm 1,34 ^{abB}	13,14 \pm 2,42 ^{aB}	27,70 \pm 4,56 ^{aA}
LC-CLME	8,50 \pm 0,55 ^{bB}	6,66 \pm 1,08 ^{cB}	3,46 \pm 0,42 ^{cC}	19,70 \pm 1,08 ^{bcA}
LC-C70ME	13,86 \pm 0,91 ^{aB}	13,62 \pm 0,37 ^{abB}	8,58 \pm 0,28 ^{bC}	16,18 \pm 0,42 ^{cdA}
BS-CLL	6,18 \pm 0,55 ^{bB}	6,90 \pm 0,50 ^{cB}	3,33 \pm 0,30 ^{cC}	10,26 \pm 0,60 ^{efA}
BS-C70L	14,74 \pm 2,36 ^{aB}	13,70 \pm 0,73 ^{aB}	8,58 \pm 1,00 ^{bC}	21,54 \pm 0,50 ^{bA}
BS-CLME	7,70 \pm 0,77 ^{bB}	5,94 \pm 0,28 ^{cC}	3,94 \pm 0,48 ^{cd}	14,74 \pm 0,63 ^{deA}
BS-C70ME	13,06 \pm 0,72 ^{aB}	11,14 \pm 0,48 ^{bC}	8,58 \pm 0,37 ^{bD}	20,90 \pm 0,73 ^{bcA}
CL	7,13 \pm 0,55 ^{bB}	6,50 \pm 0,27 ^{cB}	4,42 \pm 0,24 ^{cC}	9,46 \pm 0,86 ^{fA}
C70	13,21 \pm 0,49 ^{aB}	15,21 \pm 1,68 ^{aB}	12,41 \pm 0,27 ^{aB}	21,77 \pm 1,32 ^{bA}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). LC – *Lcb. casei*; BS – *B. subtilis*; CL – chocolate ao leite; C70 – chocolate 70%; L – cepa livre; ME – cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

Avaliando a quantidade de flavonoides na etapa oral da simulação gastrointestinal, a maioria das formulações apresentam um decréscimo no teor obtido. Este resultado está em concordância com os estudos de Gonzales *et al.* (2015) que destacam que há baixa biodisponibilidade bucal dos flavonoides no processo de digestão, especialmente devido a interação de alguns flavonoides específicos com a amilase. Esta característica é ainda mais expressiva na etapa gástrica, onde o teor decai consideravelmente em algumas amostras, tanto no chocolate com a adição das cepas quanto no chocolate sem.

Ao analisar os dados obtidos para a etapa intestinal da simulação de digestão é possível observar um aumento na quantificação de flavonoides, em ambos os casos sendo ainda maior do que o resultado inicial. Em parte, esta tendência pode estar relacionada com a influência do pH na solubilidade e consequente disponibilidade dos flavonoides para detecção. Alimentos frequentemente sofrem alterações de pH durante sua produção e processamento e mudanças ainda mais significativas de pH durante sua passagem através do canal alimentar. Por exemplo, do pH 7,0 na cavidade oral ao pH 2,0 no estômago, em seguida, pH 6,0-7,0 no intestino delgado, em direção do pH 7,0-8,0 do intestino grosso. Esta variação de pH impacta diretamente na disponibilidade dos flavonoides ao longo do processo digestório, especialmente devido a variações na solubilidade. Luo *et al.* (2012) avaliaram a solubilidade de alguns compostos caracterizados como flavonoides e constataram que há mudanças na solubilidade em função do pH. De acordo com os estudos, a rutina apresentou uma concentração livre de aproximadamente

55 μM em pH 2,0 enquanto este valor passou a 350,6 μM em pH 8,0. Sugere-se que esta característica pode estar relacionada com a mudança estrutural que ocorre em diferentes pH's, uma vez que em meio ácido muitos flavonoides podem estar em sua forma neutra, enquanto em pH próximo a 7,0 a carga passa a ser negativa.

Além do pH, existem outras características no intestino que permitem que a biodisponibilidade dos flavonoides seja otimizada. De acordo com o estudo de Chandrasekara; Shahidi (2012) em grãos, flavonoides são liberados após digestão intestinal melhor do que ácidos fenólicos altamente polares. Essa característica pode ser atribuída ao tempo de liberação mais longo e efeito de emulsificação da digestão intestinal que é indispensável para flavonoides relativamente hidrofóbicos. Além das condições físico-químicas que beneficiam a biodisponibilidade dos flavonoides no intestino, a microbiota desempenha um papel importante no metabolismo dos flavonoides encontrados nos alimentos (MUROTA; NAKAMURA; UEHARA, 2018).

4.7.3 Capacidade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade antioxidante de um produto pode ser avaliada por uma variedade de técnicas, dentre elas o método que consiste na determinação da capacidade sequestradora de radical DPPH•. Nos estudos conduzidos, optou-se por seguir o método de DPPH descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), onde o radical sintético é gerado e a capacidade da amostra para neutralizá-lo é monitorada através de um espectrofotômetro UV/visível. Nesta reação, a solução metanólica do DPPH• muda de roxo para amarelo claro e o grau de descoloração, avaliado espectralmente a 517 nm, indica o potencial de limpeza de radical livre do composto antioxidante (OLIVEIRA, 2015). Foi realizado o branco das cepas e do material de capsula, para investigar a possível interferência nos resultados obtidos, sendo observado que os mesmos não interferiram significativamente nos resultados, os mesmos não foram incluídos na discussão do trabalho.

Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 17 sendo expressos como mmol equivalente de Trolox (TEAC, μmol /1 Trolox).

Tabela 17- Determinação da capacidade sequestradora do radical DPPH• das amostras de chocolate durante a simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média ± desvio padrão) expressos em µmol TEAC/g.

Amostra	Inicial	TGI - Oral	TGI - Gástrico	TGI – Intestinal
LC-CLL	69,02±2,31 ^{cB}	65,42±1,45 ^{eFB}	68,12±0,52 ^{bB}	85,22±2,48 ^{cA}
LC-C70L	134,12±4,37 ^{aBC}	139,07±1,30 ^{bcB}	124,66±4,68 ^{aC}	155,31±6,84 ^{aA}
LC-CLME	71,82±3,83 ^{cB}	73,07±0,69 ^{eB}	67,22±2,22 ^{bB}	88,97±3,15 ^{cA}
LC-C70ME	133,37±4,37 ^{abB}	153,47±0,26 ^{aA}	110,57±2,06 ^{aC}	127,37±5,79 ^{bB}
BS-CLL	62,42±0,45 ^{cA}	60,17±9,40 ^{fA}	69,92±0,69 ^{bA}	67,07±1,37 ^{dA}
BS-C70L	127,52±5,63 ^{abBC}	128,87±3,19 ^{cdAB}	122,42±1,45 ^{aC}	138,51±6,20 ^{bA}
BS-CLME	64,37±0,69 ^{cC}	62,72±0,26 ^{efD}	66,47±0,90 ^{bB}	77,27±0,45 ^{cdA}
BS-C70ME	120,57±8,56 ^{bB}	122,87±2,93 ^{dB}	125,72±2,03 ^{aB}	162,76±5,84 ^{aA}
CL	72,27±1,24 ^{cB}	73,97±1,70 ^{eB}	73,22±2,51 ^{bB}	80,27±0,26 ^{cA}
C70	124,22±6,32 ^{abC}	148,07±6,32 ^{abB}	137,27±5,06 ^{aBC}	165,77±1,04 ^{aA}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). LC – *Lcb. casei*; BS – *B. subtilis*; CL – chocolate ao leite; C70 – chocolate 70%; L – cepa livre; ME – cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

Conforme pode ser observado em ambos os casos o chocolate 70% (Tabela 18) apresentou maior capacidade de captura do radical DPPH•, sendo de aproximadamente 120 a 135 µmol equivalente de Trolox/g de amostra. Comparativamente, Genovese; Lannes (2009) avaliaram diferentes formas de chocolate no que diz respeito a sua capacidade antioxidante e os resultados da captura do radical DPPH• para o chocolate em pó foi de aproximadamente 80 µmol equivalente Trolox/g de amostra enquanto que para o cacau em pó foi de aproximadamente 120 µmol equivalente Trolox/g de amostra.

Além disso, em ambos os casos a capacidade de captura do radical DPPH• para as amostras aumentou após a etapa de digestão intestinal quando comparado com a amostra no tempo inicial, com exceção apenas da LC-C70ME. Jara-Palacios *et al.* (2018) avaliaram o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* na composição fenólica e antioxidante de diferentes subprodutos da vinificação branca e observaram que para todos os extratos de subprodutos, a atividade radical de limpeza, medida pelo método DPPH, diminuiu para as amostras que passaram pela digestão gastrointestinal quando comparadas às amostras não digeridas, sendo de até 48% de decréscimo. As diferenças entre os resultados obtidos no presente trabalho podem ser atribuídas ao tipo de produto utilizado e sua matriz. Um estudo relatou que a capacidade dos extratos fenólicos para capturar o DPPH radical aumentou significativamente após a fase intestinal (entre 5-18%) em comparação com o observado na digestão gástrica, e esta atividade também foi maior em digestões intestinais do que em amostras não digeridas (FAWOLE;

OPARA, 2016). Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para o chocolate com e sem probiótico, mesmo nos casos em que foi realizado o processo de microencapsulação.

O método DPPH• é bastante utilizado para avaliação da capacidade antioxidante. No entanto, para caracterizar completamente um composto como antioxidante, é necessário utilizar outras metodologias, tais como o método ABTS•+ (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e FRAP (Ferric-Reducing Ability of Plasma) (OLIVEIRA, 2015).

4.7.4 Capacidade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método descrito por Re *et al.* (1999) que mensura a capacidade de sequestro do radical ABTS•+ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. A base do ensaio ABTS/PP é a interação entre um antioxidante e o radical catiônico ABTS•+. A captura do radical pode ser facilmente detectada quantitativamente devido ao branqueamento do espectro de absorção característica máxima em 414, 417, 645, 734 e 815 nm, sendo o comprimento de 734 nm utilizado nos ensaios deste trabalho. Este comprimento de onda é recomendando devido a minimização de possíveis interferências causadas pelas amostras, sendo comum em comprimentos de onda mais baixos. Utilizando o comprimento de 734 nm, um resultado de capacidade antioxidante subestimado é evitado (ILYASOV *et al.*, 2020). Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 18 e foram expressos como mmol equivalente de Trolox (TEAC, $\mu\text{mol}/1$ Trolox).

Tabela 18 - Determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS•+ das amostras de chocolate durante a simulação de passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) (média \pm desvio padrão) expressos em μmol equivalente de Trolox.

Amostra	Inicial	TGI – Oral	TGI - Gastrico	TGI - Intestinal
LC-CLL	0,93 \pm 0,02 ^{bB}	0,79 \pm 0,10 ^{cB}	0,91 \pm 0,10 ^{dB}	13,24 \pm 1,56 ^{cA}
LC-C70L	3,17 \pm 0,026 ^{aB}	3,04 \pm 0,11 ^{bB}	3,02 \pm 0,09 ^{bB}	39,97 \pm 3,42 ^{abA}
LC-CLME	1,02 \pm 0,12 ^{bB}	1,02 \pm 0,15 ^{cB}	0,88 \pm 0,10 ^{dB}	17,20 \pm 1,99 ^{cA}
LC-C70ME	3,24 \pm 0,30 ^{aB}	3,86 \pm 0,36 ^{abB}	2,56 \pm 0,19 ^{cB}	33,57 \pm 2,60 ^{bA}
BS-CLL	0,70 \pm 0,10 ^{bB}	1,01 \pm 0,10 ^{cB}	0,16 \pm 0,04 ^{eB}	9,73 \pm 0,67 ^{cA}
BS-C70L	3,72 \pm 0,48 ^{aB}	4,07 \pm 0,56 ^{aB}	2,71 \pm 0,09 ^{cB}	33,91 \pm 0,87 ^{bA}
BS-CLME	0,97 \pm 0,13 ^{bB}	0,96 \pm 0,33 ^{cB}	0,10 \pm 0,02 ^{eB}	10,67 \pm 2,22 ^{cA}
BS-C70ME	3,34 \pm 0,16 ^{aB}	3,54 \pm 0,41 ^{abB}	2,61 \pm 0,03 ^{cB}	44,75 \pm 4,64 ^{aA}
CL	1,25 \pm 0,03 ^{bB}	1,34 \pm 0,10 ^{cB}	1,17 \pm 0,09 ^{dB}	15,38 \pm 0,81 ^{cA}
C70	3,66 \pm 0,26 ^{aB}	4,19 \pm 0,40 ^{aB}	3,36 \pm 0,15 ^{aB}	46,18 \pm 4,24 ^{aA}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p>0,05$). LC – *Lcb. casei*; BS – *B. subtilis*; CL – chocolate ao leite; C70 – chocolate 70%;

L – cepa livre; ME – cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

Conforme pode ser observado, em ambos os casos, o chocolate 70% apresentou maior capacidade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS•+, sendo de aproximadamente 3 μmol equivalente de Trolox/g de amostra. Já o chocolate ao leite apresentou cerca de 1 μmol equivalente de Trolox/g de amostra. A diferença na capacidade antioxidante entre chocolate ao leite e chocolate 70% se assemelham ao que foi observado por Todorovic *et al.* (2015) ao avaliarem a presença de polifenóis e a capacidade antioxidante de diferentes chocolates produzidos na Sérvia. Os resultados obtidos pelos pesquisadores indicam que os chocolates ao leite avaliados resultaram em 14 a 24 μM de equivalente Trolox/g de amostra, enquanto os chocolates com altos teores de cacau resultaram de 63 a 92 μM de equivalente Trolox/g de amostra.

Além disso, é possível observar um aumento de aproximadamente 10 vezes na capacidade antioxidante na fase intestinal quando comparada a etapa inicial da simulação. Este resultado se assemelha ao obtido por Martini; Conte; Tagliazucchi (2018) ao avaliarem a mudança na atividade antioxidante do chocolate com altos teores de cacau ao longo do processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. Os pesquisadores observaram que o chocolate escuro apresentou aproximadamente 2 mmol Trolox/100g de chocolate na fase salival, passando para 10 mmol Trolox/100g de chocolate na fase intestinal.

De modo geral, a capacidade antioxidante também foi satisfatória para as amostras produzidas com os probióticos microencapsulados especialmente após a simulação da etapa intestinal durante a digestão.

4.7.5 Potencial antioxidante redutor férrico FRAP

Para maior detalhamento do potencial antioxidante das amostras de chocolate submetidas a digestão gastrointestinal simulada, foi realizado o ensaio FRAP. O ensaio FRAP é um método típico baseado em reação de transferência de elétrons que mede a redução do complexo de Fe^{3+} para o complexo de Fe^{2+} por antioxidantes em um meio ácido. A atividade antioxidante é determinada em decorrência do aumento da absorvância no comprimento de onda selecionado (ZHONG; SHAHIDI, 2015). Os ensaios foram conduzidos de acordo com o método proposto por Benzie; Strain (1996) adaptado por Arnous; Makris; Kefalas (2002). As absorvâncias das amostras foram determinadas em 593 nm. Os resultados foram expressos em μmol equivalente de Trolox (TEAC, $\mu\text{mol}/1$ Trolox) e podem ser verificados na Tabela 19.

Tabela 19 - Determinação do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) das amostras de chocolate durante a simulação de passagem pelo trato gastro-intestinal (TGI) (média \pm desvio padrão) expressos em μmol equivalente de Trolox.

Amostra	Inicial	TGI - Oral	TGI - Gástrico	TGI - Intestinal
LC-CLL	7,53 \pm 0,72 ^{cdB}	7,94 \pm 0,52 ^{eB}	7,18 \pm 0,28 ^{cdB}	13,58 \pm 3,55 ^{cA}
LC-C70L	12,54 \pm 0,22 ^{bBC}	10,84 \pm 1,45 ^{cC}	14,87 \pm 0,59 ^{aB}	20,21 \pm 1,35 ^{aA}
LC-CLME	5,88 \pm 0,89 ^{dB}	5,04 \pm 0,57 ^{fB}	4,50 \pm 0,75 ^{eB}	14,70 \pm 1,81 ^{bcA}
LC-C70ME	14,91 \pm 0,34 ^{aB}	14,57 \pm 0,32 ^{bB}	12,92 \pm 0,1 ^{bC}	17,33 \pm 1,00 ^{abcA}
BS-CLL	9,11 \pm 0,40 ^{cB}	8,49 \pm 0,26 ^{deBC}	8,21 \pm 0,32 ^{cC}	16,15 \pm 0,23 ^{abcA}
BS-C70L	9,08 \pm 1,23 ^{cC}	17,46 \pm 0,35 ^{aA}	15,02 \pm 0,24 ^{aB}	18,53 \pm 0,71 ^{abA}
BS-CLME	6,62 \pm 0,64 ^{dB}	6,66 \pm 0,35 ^{efB}	6,52 \pm 0,36 ^{dB}	18,56 \pm 0,47 ^{abA}
BS-C70ME	6,73 \pm 0,35 ^{dD}	15,14 \pm 0,58 ^{bB}	12,33 \pm 0,48 ^{bC}	18,79 \pm 1,19 ^{abA}
CL	6,50 \pm 0,59 ^{dC}	10,30 \pm 0,68 ^{cdB}	7,22 \pm 0,48 ^{cdC}	15,94 \pm 0,71 ^{abA}
C70	15,66 \pm 1,44 ^{aBC}	17,36 \pm 0,55 ^{aAB}	15,07 \pm 0,32 ^{aC}	18,91 \pm 0,68 ^{abA}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). LC – *Lcb. casei*; BS – *B. subtilis*; CL – chocolate ao leite; C70 – chocolate 70%; L – cepa livre; ME – cepa microencapsulada. Fonte: Autora (2022).

Conforme pode ser observado, há um aumento significativo no potencial antioxidante dos chocolates após o processo de digestão. Em avaliação dos índices de antioxidantes em diversos alimentos após a digestão gastrointestinal simulada, Koehnlein *et al.* (2016) identificaram que o chocolate antes da digestão apresenta cerca de 3000 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ de amostra e após a digestão este valor sobe para quase 4000 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ de amostra. De acordo com os autores, os valores mais elevados da capacidade antioxidante total após a digestão enzimática *in vitro* podem ser atribuídos à hidrólise parcial de fenólicos totais, aumentando o seu conteúdo.

Com base nos dados obtidos, no tempo inicial o chocolate 70% sem a adição de probióticos apresentou maior potencial antioxidante quando comparado ao chocolate ao leite. A diferença na capacidade antioxidante entre chocolate ao leite e chocolate 70% se assemelham ao que foi observado por Todorovic *et al.* (2015). Os resultados obtidos pelos pesquisadores indicam que os chocolates ao leite avaliados resultaram em 31 a 53 μM de equivalente Trolox/g de amostra, enquanto os chocolates com altos teores de cacau resultaram de 130 a 151 μM de equivalente Trolox/g de amostra. Este mesmo perfil foi observado nos chocolates contendo o *Lcb. casei* livre e microencapsulado.

Além disso, ao final do processo de digestão gastrointestinal simulada dos chocolates contendo *Lcb. casei* livre e encapsulado, foi observado um aumento entre 17 e 150% no potencial oxidante quando comparado com o tempo inicial. No entanto, ao avaliar os resultados

de FRAP para o chocolate 70% sem o probiótico ao longo da digestão, observa-se um aumento de apenas 20% após a etapa intestinal quando comparado ao tempo inicial.

De modo geral, os resultados obtidos são promissores do ponto de vista da avaliação do potencial antioxidante de chocolates acrescidos de probióticos, especialmente no que diz respeito ao ineditismo dos estudos do processo de digestão gastrointestinal simulada e seu impacto nos índices de antioxidantes nas amostras.

4.8 ANÁLISE SENSORIAL DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATE

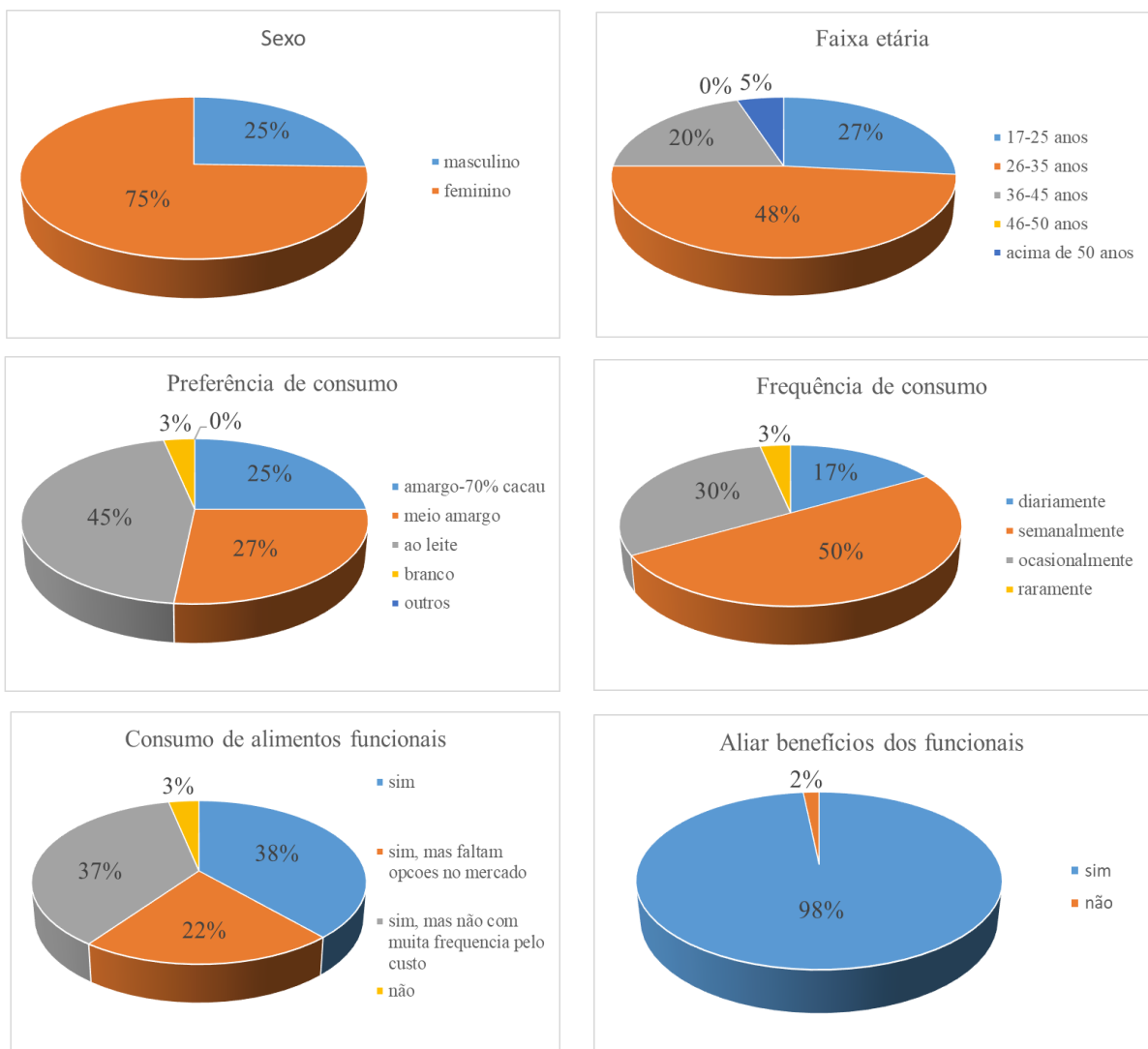
As amostras de chocolate probiótico selecionadas para avaliação da aceitabilidade sensorial foram aquelas inoculadas com as cepas *Lcb. casei* e *B. subtilis* nos seus formatos livres nas matrizes de chocolate ao leite e chocolate 70% cacau, pois elas apresentaram os melhores resultados de viabilidade. Notou-se que neste estudo, para as matrizes chocolate utilizadas, a etapa da microencapsulação não melhorou significativamente a viabilidade das cepas, durante o período de armazenamento ou durante a análise da simulação gastrointestinal. Desta forma, as amostras selecionadas para o teste de análise sensorial foram as inoculadas com as cepas *Lcb. casei* e *B. subtilis* nos seus formatos livres nas matrizes de chocolate ao leite e chocolate 70% cacau.

As respostas obtidas no questionário, referente ao perfil e hábito de consumo de chocolate dos participantes, estão apresentadas na Figura 13. A equipe de participantes foi composta, em sua maioria, pelo sexo feminino (74,54%). Isso aconteceu porque a análise foi realizada no centro de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que é constituído majoritariamente por mulheres. As faixas etárias predominantes foram entre 26-35 anos, com 48% dos provadores, e 17-35 anos com 27%, já que a maioria dos participantes era alunos de graduação, mestrado e doutorado do curso de Ciência dos Alimentos.

Com relação a preferência entre os chocolates, o ao leite se destacou em primeiro lugar com 45% dos provadores, seguido do chocolate meio amargo 27% e amargo 25%. Com relação a frequência do consumo de chocolates, a resposta semanalmente predominou com 50% dos consumidores, seguido de ocasionalmente 30% e diariamente 20%. Já para a pergunta sobre o consumo de alimentos funcionais, 38% dos provadores disseram consumir alimentos funcionais, enquanto 37% alegaram que consomem, porém, consideram o preço para esse tipo de alimento elevado, e 22% dos participantes consomem, mas consideram a variedade de

produto funcionais disponíveis no mercado reduzida. A última pergunta estava relacionada se o consumidor estaria disposto a consumir esse produto, sabendo da possibilidade de aliar benefícios a saúde por meio do consumo de chocolate, e as respostas positivas foram de 98%. Esses resultados são promissores e vão ao encontro do objetivo desse trabalho, que é contribuir com o desenvolvimento de estudos que visam a aplicação de probióticos em chocolates de modo a viabilizar um produto nacional com esse apelo e ainda inexistente no mercado nacional.

Figura 12– Perfil de preferências dos provadores das amostras de chocolates. As porcentagens em cada quesito são referentes às respostas dadas pelos provadores em relação ao número total de participantes.



Fonte: Autora (2022).

Os resultados obtidos no teste de aceitabilidade sensorial estão apresentados na Tabela 20. É possível observar que a adição das cepas probióticas não influenciou a aceitação das

amostras de chocolate nas matrizes estudadas, pois não houve diferença significativa entre as amostras adicionadas das cepas em relação as amostras controle para os atributos avaliados, exceto para textura e impressão global para a cepa *Lcb. casei* na matriz 70% cacau. Nesse caso, o chocolate probiótico apresentou uma média significativamente maior que a controle, indicando um impacto positivo da cepa da opinião do consumidor.

A escala hedônica utilizada pelos provadores para avaliar as amostras variou entre 1 e 9, onde “1” significou “desgostei extremamente”, enquanto “9” se referiu a “gostei extremamente”. Todas as amostras apresentaram uma média alta de aceitação para todos os atributos avaliados, em sua maioria situada entre os termos “gostei moderadamente” e “gostei muito”).

Tabela 20 - Análise sensorial das amostras de chocolate médias, atributos avaliados nas amostras de chocolates. As notas foram dadas utilizando a escala hedônica de 9 pontos.

Matriz	Amostra	Sabor	Textura	Impressão Global
Leite	LC-CLL	7,70 ^a	7,40 ^a	7,70 ^a
	BS-CLL	7,60 ^a	7,50 ^a	7,60 ^a
	CL	7,60 ^a	7,50 ^a	7,70 ^a
70% cacau	LC-C70L	7,40 ^a	7,60 ^a	7,40 ^a
	BS-C70L	7,30 ^a	7,20 ^{ab}	7,10 ^{ab}
	C70	6,90 ^a	7,00 ^b	6,80 ^b

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna para cada matriz de chocolate não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). **LC** – *Lcb. casei*; **BS** – *B. subtilis*; **CL** – chocolate ao leite; **C70** – chocolate 70%; **L** – cepa livre. Fonte: Autora (2022).

Esses resultados vão ao encontro daqueles reportados no estudo realizado por Succi *et al.* (2017), em que foi avaliada a aplicação de cepas probióticas do gênero *Lactobacillus* em chocolates com alto teor de cacau. No estudo, também foi utilizada a escala hedônica de 9 pontos para a avaliação dos chocolates e bons resultados foram obtidos, com notas que variaram entre 7,85-8,02. Segundo Succi *et al.* (2017), esse resultado pode estar relacionado ao fato de que os chocolates com altas concentrações de cacau (80%) e um sabor mais amargo, podem mascarar qualquer sabor incomum associado aos probióticos adicionados. Klindt-Toldam *et al.* (2016) também observaram que uma concentração de células probióticas de cerca de 8,0-9,0 log UFC/g não afetou, significativamente, as características sensoriais de chocolates.

Não foram encontrados estudos utilizando o *B. subtilis* como microrganismo potencialmente probiótico, porém podemos encontrar outros trabalhos onde o gênero *Bacillus* é aplicado em matrizes chocolates. Kobus-Cisowska *et al.* (2019) compararam chocolate probiótico com *B. coagulans* liofilizado, aplicado em uma matriz de chocolate amargo em 3 diferentes concentrações (6,0, 7,0 e 8,0 log UFC/g), com o chocolate controle. As comparações

foram realizadas por meio de um painel treinado, considerando os atributos sensoriais de cor, aroma, odor, sabor e consistência. Dentre os atributos avaliados, a variação do aroma na amostra probiótica se apresentou quase indiscernível pelos julgadores quando comparado com a amostra controle. Pequenas alterações foram observadas nos perfis de odor, enquanto diferenças significativas foram encontradas no sabor por apresentar uma sensação “picante”. Não houve influência das bactérias probióticas na cor e consistência dos chocolates examinados.

No estudo realizado por Erdem *et al.* (2014) foram produzidas e caracterizadas amostras de chocolate amargo contendo *Bacillus indicus* HU36 e fibras dietéticas. A amostra controle apresentou como média de aceitação 8,5 na escala hedônica de 9 pontos. Entretanto, as amostras de chocolate contendo as fibras não foram tão bem aceitas, sendo a pior média de aceitação de 1,2 para a amostra contendo carboximetilcelulose (CMC). O acréscimo de ingredientes não usuais no chocolate pode ter impactado na avaliação sensorial.

5 CONCLUSÃO

A microencapsulação das cepas *Lcb. casei*, *Lpb. plantarum* e *B. subtilis*, através do método da geleificação iônica, demonstrou-se eficaz para manutenção da viabilidade no tempo quando comparadas as células livres. Uma oportuna viabilidade pôde ser verificada, maior que 7,3 log UFC/g, tanto para as cepas microencapsuladas mantidas a temperatura ambiente, quanto mantidas refrigeradas por 90 dias, não havendo diferença significativa entre elas, o que é positivo do ponto de vista tecnológico para aplicação industrial em alimentos.

Em relação as matrizes estudadas, os chocolates apresentaram potencial aplicativo para a cepa *Lcb. casei* no seu formato livre, mantendo uma viabilidade acima de 6,0 log UFC/g (chocolate ao leite) após 90 dias e acima de 5,9 log UFC/g para o chocolate 70% cacau. Enquanto as amostras adicionadas das cepas microencapsuladas apresentaram perdas significativas ficando abaixo de 4,0 log UFC/g para o chocolate 70% cacau e para o ao leite abaixo do limite de detecção da análise. Os resultados para o *B. subtilis* foram ainda mais promissores com a manutenção da viabilidade para ambos os chocolates e formatos de adição da cepa, livre ou encapsulada, com viabilidades maiores que 8,3 log UFC/g. A aplicação dessa cepa potencialmente probiótica em matriz chocolate é pioneira no setor e no estado da arte científico.

Quando aplicada nos chocolates verificou-se a baixa viabilidade da cepa *Lpb. plantarum* durante *shelf life*, o que justificou prosseguir os testes com apenas as cepas de *Lcb. casei* e *B. Subtilis*. Estas foram analisadas quanto a simulação da passagem pelo TGI, quantificação de fenólicos, flavonóides, antioxidantes e análise sensorial.

Quanto a análise de sobrevivência das cepas aos fluidos gastrointestinais simulados, foi encontrada uma excelente proteção das matrizes chocolate as cepas. Os dados obtidos expressaram dados promissores, acima de 7,9 log UFC/g, tanto para as cepas em condição livre quanto microencapsulada aplicadas na matriz de chocolate ao leite e de chocolate 70% cacau, o que demonstra o seu potencial para incorporação de probióticos. O alto teor de gordura e também de compostos fenólicos, principalmente no chocolate 70% cacau, propiciaram um ambiente de manutenção das cepas potencialmente probióticas, que por outro lado não alteraram alguns dos parâmetros essenciais para o consumo do produto, como sabor e textura.

Para o gênero *Lactobacillus*, os compostos fenólicos, flavonoides e antioxidantes, presentes no chocolate, podem ter reduzido o stress oxidativo das células, prolongando a viabilidade dos probióticos nas amostras durante a estocagem. Isto foi melhor observado quanto a viabilidade para as cepas adicionadas as matrizes chocolate 70% cacau, rica em compostos

fenólicos, flavonoides e antioxidantes. Já para o gênero *Bacillus* não se observou uma relação direta na viabilidade em função da quantidade desses compostos na matriz.

A análise sensorial, realizada por 60 provadores não treinados, as notas obtidas foram acima de 7,0 na escala hedônica de 9 pontos. A boa aceitação desses produtos, a manutenção da viabilidade dos probióticos na matriz alimentícia, além do alto teor de compostos antioxidantes encontrados no estudo, indicam o grande potencial do chocolate para a diversificação dos alimentos probióticos disponíveis atualmente no mercado.

Os resultados de aceitação do produto, juntamente com a viabilidade das cepas livres na matriz alimentícia e o alto teor de compostos antioxidantes encontrados neste estudo, indicam o potencial do chocolate probiótico para a diversificação destes produtos no mercado. O somatório de resultados positivos, tanto tecnológicos, como nutricionais, tornam estudos de escala industrial com transferência da tecnologia para empresas interessadas na inovação uma perspectiva futura.

REFERÊNCIAS

- AHN, K. B. *et al.* *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192694, 8 fev. 2018.
- ALMADA, C. N. DE. **Probiotic *Bacillus*: behavior during food processing, in vitro and in vivo functionality, modulation of gut microbiota and health impacts**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.
- ALMEIDA, H. V. DE. **Características físicas e físico-químicas de partículas de alginato e quitosana obtidas por gelificação iônica**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- ALVES, K. C. S. *et al.* *Bacillus subtilis* : uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 2, p. 15–23, 2018.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 240–251, maio 2007.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 655–665, dez. 2002.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160–169, ago. 2017.
- ASSUNÇÃO, L. S. *et al.* **Estudo prospectivo sobre encapsulamento de compostos bioativos**. 5th International Symposium on Technological Innovation. **Anais...** Universidade Federal do Sergipe, 26 set. 2014. Disponível em: <<http://www.portalmite.com.br/conferences/index.php/ISTI/isti2014/paper/view/51/28>>
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-**, v. 139, p. 1–66, 2004.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, fev. 2006.
- BARROSO, T. L. C. T. *et al.* Tecnologia de encapsulamento na área de alimentos: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e6210716240, 14 jun. 2021.
- BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. New York: [s.n.].
- BELIAVSKAIA, V. A. *et al.* [Adjuvant properties of subalin, a recombinant interferon-producing probiotic]. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii**, n. 6, p. 77–

82, 2001.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160–174, 2012.

BINDA, S. et al. Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 24 jul. 2020.

BORGATO, A. B. B.; MELLO, T. A. **Desenvolvimento de barra de chocolate enriquecida**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados, 2018.

BRAGANTE, A. **Processamento de cacau e fabricação de chocolate**. Disponível em: <[https://abgtecalim.yolasite.com/resources/Processamento de Cacau e Chocolate.pdf](https://abgtecalim.yolasite.com/resources/Processamento%20de%20Cacau%20e%20Chocolate.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2022.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. **Resolução Nº 12, de 1978**. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas, para efeito em todo território brasileiro. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1978. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnpa/1978/res0012_30_03_1978.html#:~:text=As%20hortali%C3%A7as%20dever%C3%A3o%20apresentar%20colora%C3%A7%C3%A3o,p%20ermidadas%20rachaduras%20cortes%20e%20perfura%C3%A7%C3%B5es> Acesso 12 jun 2022.

BRASIL. **Resolução-RDC Nº 264, de 22 de setembro de 2005**. Dispõe sobre o regulamento técnico para chocolate e produtos de cacau. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-264-de-22-de-setembro-de-2005.pdf/view>> Acesso 12 jun 2022.

BRASIL. **Resolução da Reitoria Colegiada RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900> Acesso 12 jun 2022.

BREGNI, C. et al. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. **Ars Pharmaceutica**, v. 41, n. 3, p. 245–248, 2000.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 18 abr. 2019.

- BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 4, 2007.
- BUŠIĆ, A. *et al.* Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. **Food Research International**, v. 111, p. 244–255, set. 2018.
- CAMBIAGHI, L. *et al.* Os probióticos na odontologia: história, conceitos e aplicações na periodontia. **Perionews**, v. 7, n. 1, p. 18–24, 2013.
- CAMILLERI, M. Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 264–269, mar. 2006.
- CARMO, E. L. DO; FERNANDES, R. V. DE B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por *spray drying*, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 1, n. 2, p. 30–44, 18 nov. 2015.
- 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, abr. 2007.
- CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 226–237, jan. 2012.
- CHEN, C.-C.; WALKER, W. A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Advances in Pediatrics**, v. 52, p. 77–113, jan. 2005.
- CHEN, G.L. *et al.* Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 243–259, ago. 2015.
- CHEN, Y.H. *et al.* Probiotic *Lactobacillus* spp. act Against *Helicobacter pylori*-induced Inflammation. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 90, 14 jan. 2019.
- CHING, S. H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 13 abr. 2017.
- CHUN, H.; KIM, C.-H.; CHO, Y.-H. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, n. 5, p. 692–699, 31 out. 2014.
- COPPOLA, M. DE M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297–1303, ago. 2004.
- CORRÊA, N. B. O. *et al.* A Randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Infants.

Journal of Clinical Gastroenterology, v. 39, n. 5, p. 385–389, maio 2005.

COSTA, E. DOS S.; VARAVALLO, M. A. Probióticos e Prebióticos: Relações com a imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC**, v. 4, n. 2, p. 4–11, 2011.

CRUXEN, C. E. DOS S. *et al.* Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT**, v. 75, p. 379–385, jan. 2017.

CUEVA, C. *et al.* In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 3, p. 792–805, mar. 2013.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214–220, abr. 2011.

DA COSTA, G. M. *et al.* Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT**, v. 75, p. 195–201, jan. 2017.

DALLABRIDA, J. C. **Antioxidantes do chocolate amargo e do vinho tinto**. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

DAS, K. *et al.* Recombinant *Bacillus subtilis* spores for the delivery of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-CFP10 secretory antigens. **Tuberculosis**, v. 101, p. S18–S27, dez. 2016.

DE SOUZA, E. L. *et al.* Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1645–1659, 31 maio 2019.

DE SOUZA, R. D. *et al.* *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87454, 27 jan. 2014.

DELIA, P. *et al.* Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 6, p. 912, 2007.

DEWANTO, V. *et al.* Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3010–3014, 8 maio 2002.

DJIKENG, F. T. *et al.* Effect of traditional and oven roasting on the physicochemical properties of fermented cocoa beans. **Heliyon**, v. 4, n. 2, p. e00533, fev. 2018.

DOMINGO, J. Revisão do papel dos probióticos nas doenças gastrointestinais em adultos. **Gastroenterologia e Hepatologia**, v. 40, p. 3010–3014, 2017.

DONG, W.; BODMEIER, R. Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, n. 1–2, p. 128–138, dez. 2006.

DOUND, Y. A. *et al.* The effect of probiotic *Bacillus subtilis* HU58 on immune function in

healthy human. **The Indian Practitioner**, v. 70, n. 9, 2017.

DUC, L. H. *et al.* Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. **Vaccine**, v. 25, n. 2, p. 346–355, jan. 2007.

ERDEM, Ö. *et al.* Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 187–193, abr. 2014.

EVANOVICH, E.; DE SOUZA MENDONÇA MATTOS, P. J.; GUERREIRO, J. F. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: an overview. **International Journal of Genomics**, v. 2019, p. 1–11, 10 abr. 2019.

FAVARIN, L. **Microencapsulação de *Bifidobacterium* spp. pela técnica da emulsão em alginato de sódio: efeito de diferentes concentrações de mel.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Serópedica, 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S. Developments in probiotic encapsulation. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, n. 004, 1 abr. 2011.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 485–494, 29 jan. 2002.

FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 358, 13 dez. 2016.

FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 5, p. 4745–4767, 5 maio 2014.

FREIRE, T. T. *et al.* Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e513101119964, 7 set. 2021.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of applied bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365–378, maio 1989.

GADHIYA, D.; PATEL, A.; PRAJAPATI, J. B. Current trend and future prospective of functional probiotic milk chocolates and related products – a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 33, n. No. 4, p. 295–301, 3 jun. 2016.

GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. DA S. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 810–814, dez. 2009.

GOMBOTZ, W. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 267–285, 4 maio 1998.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, v. 64, p. 12–22, 1999.

GOMES, L. DA S.; NASCIMENTO, V. Extraction of total fats from chocolate through soxhlet and qualitative evaluation of the antioxidant capacity. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 4, p. 1239–1248, 2019.

GONZALES, G. B. *et al.* Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure–activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. **Drug Metabolism Reviews**, v. 47, n. 2, p. 175–190, 3 abr. 2015.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 7–8, p. 330–347, jul. 2004.

GUARNER, F. **Diretrizes mundiais da organização mundial de gastroenterologia: guias práticas probióticos e prebiótico**. Disponível em: <<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-portuguese-2011.pdf>>.

HASHEMI, S. M. B. *et al.* Synbiotic potential of doogh supplemented with free and encapsulated *Lactobacillus plantarum* LS5 and *Helianthus tuberosus* inulin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4579–4585, 11 jul. 2015.

HEURTAULT, B. *et al.* Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, out. 2003.

HILL, C. *et al.* 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, n. 8, p. 506–514, 10 ago. 2014.

HINC, K. *et al.* Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 2, 18 dez. 2010.

HOSSAIN, M. I. *et al.* Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. **LWT**, v. 118, n. June 2019, p. 108864, jan. 2020.

HUQ, T. *et al.* Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 61–69, jul. 2017.

ILYASOV, I. R. *et al.* ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1131, 8 fev. 2020.

ISTICATO, R. *et al.* Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 98, 29 dez. 2013.

JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 531–542, mar. 2014.

JARA-PALACIOS, M. J. *et al.* Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food Research International**, v. 109, p. 433–439, jul. 2018.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 39–48, 2002.

KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 29–36, jan. 1994.

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

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, out. 2014.

KIOUSI, D. *et al.* Probiotics in extraintestinal diseases: current trends and new directions. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 788, 5 abr. 2019.

KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E. E. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 269–290, 1 out. 2009.

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

KOBUS-CISOWSKA, J. *et al.* Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients. **Food & Function**, v. 10, n. 2, p. 997–1006, 2019.

KOEHNLEIN, E. A. *et al.* Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 614–623, 17 ago. 2016.

KONAR, N. *et al.* Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 35–44, mar. 2016.

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

KWON, H.-K. *et al.* Generation of regulatory dendritic cells and CD4 + Foxp3 + T cells by

probiotics administration suppresses immune disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2159–2164, 2 fev. 2010.

LAHTINEN, S. J. *et al.* Effect of starch and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 500–505, maio 2007.

LAMAS, M. C. *et al.* Calcium alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 8, p. 825–829, 30 jan. 2001.

LEE, S. *et al.* Development of a *Bacillus subtilis* -Based Rotavirus Vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 11, p. 1647–1655, nov. 2010.

LEFEVRE, M. *et al.* Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study. **Immunity & Ageing**, v. 12, n. 1, p. 24, 3 dez. 2015.

LI, K. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus casei* BNCC 134415 under lyophilization enhances cell viability during cold storage and pasteurization, and in simulated gastrointestinal fluids. **LWT**, v. 116, p. 108521, dez. 2019.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1–2, p. 26–39, nov. 2008.

LIU, Y.-W.; LIONG, M.-T.; TSAI, Y.-C. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 601–613, 23 set. 2018.

LUO, Z. *et al.* Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 84–90, abr. 2012.

MACK, D. R. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, v. 52, n. 6, p. 827–833, 1 jun. 2003.

MAHMOUD, M. *et al.* Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03541, mar. 2020.

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, out. 2013.

MANDAL, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1190–1195, out. 2006.

MARCIAL-COBA, M. S. *et al.* Dark chocolate as a stable carrier of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus casei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 2, 1 jan. 2019.

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

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 15 set. 2017.

MARQUES, C. G. *et al.* Prebióticos e probióticos na saúde e no tratamento de doenças intestinais: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e6459109071, 12 out. 2020.

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

MARTINI, S.; CONTE, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars. **Food Research International**, v. 97, p. 15–26, jul. 2017.

MARTINI, S.; CONTE, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after in vitro gastro-intestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 424–436, out. 2018.

MARTINS, E. *et al.* Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 8, p. 754–771, 17 nov. 2017.

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

MATSUZAKI, T.; SHIMIZU, Y.; YOKOKURA, T. Augmentation of antimetastatic effect on Lewis lung carcinoma (3LL) in C57BL/6 mice by priming with *Lactobacillus casei*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 179, n. 3, jul. 1990.

MAURIELLO, E. M. F. *et al.* Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22, n. 9–10, p. 1177–1187, mar. 2004.

MCCLEMENTS, D. J. Recent progress in hydrogel delivery systems for improving nutraceutical bioavailability. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 238–245, jul. 2017.

MEDEIROS, N. DA S. *et al.* Total phenolic content and antioxidant activity of different types of chocolate, milk, semisweet, dark, and soy, in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of wistar rats. **Biochemistry Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

MENESES, T. S. C. *et al.* Perfil de consumo de alimentos probióticos funcionais: uma análise com estudantes da Universidade Federal de Sergipe – UFS. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. e198101724440, 24 dez. 2021.

- MIRANDA, B. L. *et al.* Probióticos naturais para a prevenção e tratamento de doenças crônicas: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e30810514930, 8 maio 2021.
- MIRKOVIĆ, M. *et al.* The sensory quality and volatile profile of dark chocolate enriched with encapsulated probiotic *Lactobacillus plantarum* bacteria. **Sensors**, v. 18, n. 8, p. 2570, 6 ago. 2018.
- MONTEIRO, J. F. DE C. G. **Uso de probióticos na prevenção e tratamento de doenças intestinais**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2012.
- MORAIS, M. B. DE; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 8, p. 189–197, 6 nov. 2006.
- MORTAZAVIAN, A. *et al.* Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2007.
- MUROTA, K.; NAKAMURA, Y.; UEHARA, M. Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 600–610, 3 abr. 2018.
- NADERI, A. *et al.* Study of antagonistic effects of *Lactobacillus* strains as probiotics on multi drug resistant (MDR) bacteria isolated from urinary tract infections (UTIs). **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 201–208, 2014.
- NAMI, Y. *et al.* Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 9, p. 492–502, set. 2014.
- NEBESNY, E. *et al.* Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 1, p. 33–42, 13 maio 2007.
- NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. DA C. R. Probióticos - revisão da literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487–492, 1 out. 2011.
- NUNES, M. L.; GARRIDO, M. P. A obesidade e a ação dos prebióticos, probióticos e simbióticos na microbiota intestinal. **Nutrição Brasil**, v. 17, n. 3, p. 189, 3 abr. 2019.
- OLIVEIRA, A. L. DE. O papel dos simbióticos na prevenção, tratamento e modulação da resposta inflamatória em pacientes com carcinoma colorretal. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 4, p. 23–31, 2009.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, mar. 2015.
- ONELLI, R. R. V. **Influência da torra na qualidade de chocolates desenvolvidos com diferentes concentrações de massa de cacau**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2021.

- PEDROSO, D. DE L. *et al.* Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127–132, out. 2012.
- PEREIRA, A. L. F. *et al.* Storage stability and acceptance of probiotic beverage from cashew apple juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155–3165, 30 nov. 2013.
- 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, jun. 2011.
- PERMPOONPATTANA, P. *et al.* Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. **Beneficial Microbes**, v. 3, n. 2, p. 127–135, 1 jun. 2012.
- POLETO, G. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v. 49, n. 2, 2019.
- RADDATZ, G. C. *et al.* Viability and stability evaluation of *Lactobacillus casei* LC03 co-encapsulated with red onion (*Allium cepa* L.) peel extract. **LWT**, v. 153, p. 112434, jan. 2022.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1–7, jan. 2010.
- 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 de Sociologia e Política**, v. 16, n. 31, p. 85–100, nov. 2008.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.
- REN, D.-Y. *et al.* Lactobacilli reduce chemokine IL-8 production in response to TNF- α and *Salmonella* challenge of Caco-2 cells. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 1–10, ago. 2021.
- RUFINO, M. DO S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, p. 3–6, 2006.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, mar. 2006.
- SAMPAIO, G. L. A. **Encapsulação por gelificação iônica e spray drying de um concentrado rico em licopeno obtido a partir da melancia**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

- SAZAWAL, S. *et al.* Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 374–382, jun. 2006.
- SHAHANAS, E. *et al.* Health benefits of bioactive compounds from cocoa (*Theobroma cacao*). **Agricultural Reviews**, v. 40, n. 2, p. 143–149, 26 ago. 2019.
- SHOAEI, F. *et al.* The assessment of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* survivability in rose petal jam and the changes in physicochemical, textural and sensorial characteristics of the product during storage. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6200, 13 dez. 2022.
- SILVA, M. P. DA. **Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo contendo micro-organismos probióticos na forma livre e encapsulada**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- SILVA, P. T. DA *et al.* Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304–1311, jul. 2014.
- SILVA, V. S. DA; ORLANDELLI, R. C. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 182–194, 2019.
- SILVA, M. P. *et al.* Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT**, v. 75, p. 640–647, jan. 2017.
- SILVEIRA, D. **Efeitos imuno-moduladores de *Lactobacillus bulgaricus* no câncer colorretal associado à colite**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.
- SIM, S. Y. J. *et al.* Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. **Food Chemistry**, v. 200, p. 46–54, jun. 2016.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144 LP – 158, 1 jan. 1965.
- SLYKERMAN, R. F. *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. **EBioMedicine**, v. 24, p. 159–165, out. 2017.
- SOARES, B. S.; NAVARRO, A. C. Avaliação dos níveis séricos de imunoglobulina a e consequente resposta do sistema imunológico mediante a suplementação de probióticos e a prática de natação. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 4, n. 24, p. 494–501, 2010.
- SOUZA, C. H. DE *et al.* Teores de flavonoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes tipos e marcas de chocolates comerciais. **Revista da Universidade Vale do Rio**

Verde, v. 18, n. 1, p. 434–444, 2020a.

SOUZA, C. M. D. DE *et al.* Probióticos e a indústria de alimentos: uma visão geral. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 3, p. 80–101, 2020b.

SUAVE, J. *et al.* Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12–20, 2006.

SUCCI, M. *et al.* Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 60–67, ago. 2017.

TAKADA, M. *et al.* Beneficial effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota on academic stress-induced sleep disturbance in healthy adults: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 2, p. 153–162, 26 abr. 2017.

TEWES, F.; BOURY, F.; BENOIT, J.-P. Biodegradable microspheres: advances in production technology. In: BENITA, S. (Ed.). **Microencapsulation: Methods and industrial applications**. 2nd ed. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 1–53.

THEOPHILO, I. DE P. P.; GUIMARÃES, N. G. Tratamento com probióticos na síndrome do intestino irritável. **Comunicação em ciências da saúde**, v. 19, n. 3, p. 271–281, 2008.

TODOROVIC, V. *et al.* Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 137–143, ago. 2015.

TOKER, O. S. *et al.* Stability of lactic acid bacteria in synbiotic sugared and sugar-free milk chocolates. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 2, p. S1354–S1365, 30 jun. 2017.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; SELMA, M. V.; ESPÍN, J. C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 19, n. 6, p. 471–476, nov. 2016.

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, jul. 2014.

VALDÉS, L. *et al.* The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. **Food & Function**, v. 6, n. 8, p. 2424–2439, 2015.

VANISKI, R.; CORTI, D.; DRUNKLER, D. A. Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n. 1, p. 156, 21 out. 2017.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 83, 15 jul. 2008.

VÁSQUEZ, A. *et al.* DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S

rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 430–441, jul. 2005.

VIANA, C. C. R. *et al.* Microencapsulamento de bactérias probióticas: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. 1–11, 2021.

WANG, H.; WANG, Y.; YANG, R. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 933–949, 6 fev. 2017.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I.; MARCO, M. L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 364–367, jan. 2010.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probiotics and fermented dairy foods - a review. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49–57, 2013.

YOO, I.-K. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 6, p. 428–433, nov. 1996.

ZANETTI, B. G.; SOLDI, V.; LEMOS-SENNA, E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, jun. 2002.

ZANJANI, M. A. K. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 26, p. 5511–5517, 12 jul. 2012.

ZHANG, L.; LOU, Y.; SCHUTYSER, M. A. I. 3D printing of cereal-based food structures containing probiotics. **Food Structure**, v. 18, p. 14–22, out. 2018.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 1 abr. 2020.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods | This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 287–333.

ZHOU, Z. *et al.* Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 104–110, 1 jan. 2015.

ZHU, A. *et al.* Inter-individual differences in the gene content of human gut bacterial species. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 82, 21 dez. 2015.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or

processes and methods to make them. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC', V. A. (Eds.). .
Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. 1. ed.
New York, NY: Springer New York, 2010. p. 3–29.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Pesquisador Responsável: Juliano De Dea Lindner

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga, 1346, bairro Itacorubi, Florianópolis, SC, 88034-001.

Fone: (48)3721-6183; (47)996492421

Email: juliano.lindner@ufsc.br

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEPESH - UFSC

Prédio Reitoria II, Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401, bairro Trindade, Florianópolis, SC, 88.040-400.

Email: cep.propesq@contato.ufsc.br

Fone: (48) 3721-6094

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa/estudo:

“VIABILIDADE DE CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS APLICADAS EM CHOCOLATE FUNCIONAL”

Você (provador) está sendo convidado a participar, como voluntário, de uma pesquisa científica associada ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Abaixo seguem informações a respeito da pesquisa, vamos ler com atenção este documento para que sua participação seja resultante de uma decisão bem informada. Caso aceite fazer parte da pesquisa, por favor, rubrique as páginas e assine ao final deste documento (nas duas vias). Uma das vias é sua (assinada pelos pesquisadores) e a outra via é do pesquisador responsável.

1- DO OBJETIVO

Esse estudo tem por objetivo avaliar a aplicação de microrganismos potencialmente probióticos em chocolate funcional 70% e chocolate ao leite. O chocolate foi escolhido por ser um produto muito apreciado por consumidores de todas as faixas etárias, além disso, não temos no mercado brasileiro um produto similar, sendo uma possibilidade de diversificação dos produtos probióticos já comercializados (na grande maioria iogurtes). Para tanto, será realizada uma análise sensorial dos chocolates funcionais e ao leite adicionados dos microrganismos probióticos para determinar se os produtos desenvolvidos são aceitos pelos consumidores. A análise sensorial é uma ferramenta de suma importância para o sucesso na produção de novos produtos.

2- DA ANÁLISE

Sua participação nessa pesquisa consistirá em provar as amostras de chocolate e preencher às perguntas solicitadas na ficha de avaliação de acordo com sua opinião sobre o produto. Serão testados (i) chocolates comerciais sem adição de probióticos (componentes da formulação: açúcar, leite em pó, manteiga de cacau, massa de cacau, gordura vegetal, emulsificante lecitina de soja e aromatizante) e (ii)

chocolate comercial, que além dos ingredientes citados anteriormente, terá a inclusão (inóculo) de microrganismos probióticos do gênero *Lactobacillus* e *Bacillus*, já utilizados pela indústria de alimentos (de *status* GRAS ou QPS pela FDA ou EFSA, respectivamente) e comercializados em alimentos, como por exemplo, iogurtes. Serão recrutados 60 voluntários para realizar os testes. A duração do teste para cada voluntário será de, aproximadamente, 8 minutos. A inclusão (inóculo) dos microrganismos no chocolate foi realizada de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação em ambiente controlado de produção de alimentos (Usina de Processamento de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC). Análises de qualidade e segurança microbiológica, segundo a RDC 331 e IN 60 de 2019 da ANVISA, foram executadas previamente nos chocolates oferecidos.

3- DO TESTE

Os testes para avaliação sensorial dos chocolates probióticos serão conduzidos pelo pesquisador professor Juliano De Dea Lindner e pela mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC, Jocelane Zoldan. Caso o provador participante, por necessidade após o estudo, queira contatar os pesquisadores, poderá entrar em contato direto através do telefone celular (47)996492421 ou via e-mail: juliano.lindner@ufsc.br. Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa. Durante o teste sensorial, o provador será esclarecido sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar.

4- DO RESSARCIMENTO DE DESPESAS

O referente estudo será realizado de forma voluntária nas dependências do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC. Neste projeto não estão previstos gastos. Entretanto, caso você tenha despesas comprovadamente referentes a este projeto, você será ressarcido de acordo com a Resolução CNS 466/12.

5- DO SIGILO E PRIVACIDADE

O provador que optar por participar da pesquisa de forma voluntária, através do presente TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE), poderá se recusar a continuar com a avaliação e interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelos pesquisadores. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e utilizará os dados única e exclusivamente para os fins desta pesquisa, não sendo coletados, inclusive, dados sensíveis e de ordem pessoal. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Os dados desta pesquisa serão guardados pelos pesquisadores por cinco anos.

Você poderá ou não autorizar, através de TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM E DEPOIMENTOS, os pesquisadores (Juliano De Dea Lindner e Jocelane Zoldan) deste estudo a realizar fotos e/ou vídeos e/ou seu depoimento sem quaisquer ônus financeiros a nenhuma das partes. Ao mesmo tempo, você poderá ou não liberar a utilização das fotos e/ou vídeos (suas respectivas cópias) e/ou depoimentos somente para fins científicos e de estudos (livros, artigos e slides), em favor da pesquisa aqui citada, sem ser identificado por nome ou qualquer outra forma. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, a outra será fornecida a você.

6- DOS RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos específicos decorrentes da ingestão dos produtos da presente pesquisa são de ordem gastrointestinal e alergênicos. Os participantes que, de alguma forma, apresentaram histórico de alergia

ou intolerância a algum componente da formulação (açúcar, leite em pó, manteiga de cacau, massa de cacau, gordura vegetal, emulsificante lecitina de soja, aromatizante e microrganismo probiótico) não devem participar da pesquisa. Os microrganismos embora sejam considerados popularmente como “bactérias do bem”, podendo ajudar na regulação da flora intestinal, por exemplo, são contraindicados para pessoas de grupos de risco como, por exemplo, indivíduos com histórico de intolerância ao uso de alimentos probióticos, com síndrome do intestino curto, imunocomprometidos e idosos, dos quais serão orientados e recomendados a não participarem da pesquisa. Com relação aos indivíduos alérgicos, o chocolate usado nesta pesquisa apresenta as seguintes orientações quanto a alergênicos: **ALÉRGICOS: CONTÊM LEITE, PODE CONTER CASTANHA DE CAJÚ E CASTANHA DO BRASIL. NÃO CONTÉM GLÚTEN.**

7- DO RESSARCIMENTO

Caso o participante venha a observar algum desconforto, reação alérgica, alteração ou qualquer situação anômala fisiológica após a ingestão do chocolate, os pesquisadores encaminharão as devidas condutas para averiguação médica, assumindo todas as despesas decorrentes para deslocamento, exames e medicamentos, se for o caso. Caso ocorram danos decorrentes da ingestão dos produtos, será garantido o direito a indenização para o reparo ao dano, seja ele material ou imaterial devidamente comprovado que foi causado pela sua participação na pesquisa.

8- BENEFÍCIOS

O provador não obterá benefício direto com a pesquisa. Entretanto, esperamos que essa pesquisa forneça ferramentas para o desenvolvimento de processos para produção de alimentos que sejam atraentes no ponto de vista sensorial e nutricional aos consumidores de chocolates.

9- DAS NORMAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEPESH, CONEP – Ministério da Saúde. O Sistema CEP/CONEP é integrado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/CNS/MS do Conselho Nacional de Saúde e pelos Comitês de Ética em Pesquisa – CEP, compondo um sistema que utiliza mecanismos, ferramentas e instrumentos próprios de inter-relação, num trabalho cooperativo que visa, especialmente, à proteção dos participantes de pesquisa do Brasil, de forma coordenada e descentralizada por meio de um processo de acreditação. A Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos foi seguida pelos pesquisadores. O participante pode reportar-se a ela caso necessário durante o estudo.

10- DO CONSENTIMENTO

Os pesquisadores Juliano De Dea Lindner e Jocelane Zoldan declaram que cumprirão os termos da resolução 466/2012 e/ou 510.

Desta forma, concordo de maneira livre e esclarecida em participar da pesquisa: “VIABILIDADE DE CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS APLICADAS EM CHOCOLATE FUNCIONAL”. Além de ter lido e entendido todas as informações fornecidas sobre minha participação na pesquisa, tive oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente.

Participante da pesquisa

Pesquisador Responsável

Florianópolis, ____ de _____ 202__.

Observação: Este documento foi elaborado em duas vias, rubricadas e assinadas pelos participantes da pesquisa e pesquisadores.

ANEXO B – Questionário de Consumo

Nome: _____

Questionário de Consumo

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

1. Faixa etária: ()17-25 () 26-35 ()36-45 ()46-50 ()acima de 50
2. Você prefere qual tipo de chocolate?
()Amargo, 70% cacau () Meio amargo () Ao leite () Branco () Outros
3. Qual a frequência que você consome chocolate?
() Diariamente
() Semanalmente
() Ocasionalmente
() Raramente
4. Você costuma consumir alimentos funcionais, ou seja alimentos que contenham ingredientes que são benéficos a saúde?
() Sim
() Sim, mas faltam opções no mercado
() Sim, mas não com muita frequência pelo custo
() Não, porque:

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

Obrigada!

ANEXO C – Relatório de Ensaio



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



RELATÓRIO DE ENSAIO

Protocolo: 1552/2022 Data de Entrada: 24/06/2022

Nome do Produto: CHOCOLATE Data de Fabricação: NA Data de Vencimento: NA
Marca: LACTA Temp. do Rec. da Amostra: 20°C
Data e Hora da Coleta: NA Nº do Lote: T3 Nº do Lacre: NA
N. Amostras: 1 NP.Unid. Amostras: 1 Peso/Volume: 1,00 unidade
Amostrado e Coletado por: Cliente Embalagem: plástica
Fabricante: NÃO SE APLICA

Solicitante: JOCELANE ZOLDAN
Responsável: JOCELANE ZOLDAN
Av./Rua: Rua Pastor Willian Richard, 884
Complemento:
Bairro: Itacorubi CEP: 88034-100
Cidade: Florianópolis UF: SC
CNPJ/CPF: 051.856.859-80 Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Fabricação: 02/2022 Validade: 02/2023
Fabricante: Lacta

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 24/06/2022 DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 29/06/2022

MICROBIOLOGIA Analista: SCHEILA MACEDO PINTO AVILA - CRO-13202068

Contagem de Bolores e leveduras $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g^(*)

Contagem de Enterobacteriaceae $< 1,0 \times 10^1$ UFC/g^(**)

Pesquisa de Salmonella spp (VIDAS®) Ausente em 25 g^(***)
Salmonella(SLM) Easy - 48h

Metodologia(s):

(*)AOAC Official Method 2011.03 VDA98 Salmonella (SLM) Assay Screening Method. 21 ed, 2010.

(**)ISO 21527-2: 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.

(***)ISO 21528-2: 2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count technique

Documento Nº	Revisão	Data de Emissão	Página
02-POP-001-1.0	01	24/06/2022	1 de 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone: (48) 3334-2047/ 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



RELATÓRIO DE ENSAIO

Protocolo: 1552/2022 Data de Entrada: 24/06/2022

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

O LABCAL não leva em consideração a incerteza de medição para a declaração de conformidade.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 14 de Julho de 2022

Assinado eletronicamente por
SCHIELA MACEDO PINTO
AVELASQUEZ308991
Data: 2022.07.14 09:00:02

Assinado Autorizado

Este protocolo foi emitido para WEB. É possível realizar a validação do mesmo pelo site: <http://www.labcal.ufsc.br>, clicando no menu VALIDAR LAUDO e informando o seguinte código: 5541.020.2215.520.0240.645

Documento Nº	Revisão	Data de Emissão	Página
554-PPAF-001-72	00	24/06/2022	2 de 2