

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CÂMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NAJARA PINTO RIBEIRO BARRO

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus helveticus* POR *SPRAY DRIER* E
APLICAÇÃO EM CHOCOLATE BRANCO

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO DE 2021.

NAJARA PINTO RIBEIRO BARRO

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus helveticus* POR SPRAY DRIER E
APLICAÇÃO EM CHOCOLATE BRANCO**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Orientadores: Dr^a Eunice Valduga.

Dr Marcelo Mignoni.

**ERECHIM – RS
MARÇO DE 2021.**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus helveticus* POR SPRAY DRIER E
APLICAÇÃO EM CHOCOLATE BRANCO**

Najara Pinto Ribeiro Barro

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Eunice Valduga, Dr^a.
Orientadora

Prof. Marcelo Mignoni, Dr.
Orientador

Prof^a. Clarissa Dalla Rosa, Dr^a.
UFFS Campus Erechim

Prof^a. Elisandra Rigo, Dr^a.
UDESC Campus Pinhalzinho

Prof. Rogério Luis Cansian, Dr.
URI Erechim

Ilizandra Aparecida Fernandes, Dr^a.
URI Erechim

Erechim, 08 de março de 2021.

B277m Barro, Najara Pinto Ribeiro

Microencapsulação de *Lactobacillus helveticus* por spray drier e aplicação em chocolate branco / Najara Pinto Ribeiro Barro. – 2021.

102 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Profª Dra Eunice Valduga, Prof. Dr. Marcelo Mignoni”

1. Chocolate branco 2. Probiótico 3. Spray drier I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Lourdes, ao meu pai Devarvino
(*in memoriam*) ao meu marido, Belmar e aos
meus filhos Cecília e Arthur.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lourdes e Devarvino (*in memoriam*), que sempre me apoiaram para realização dos meus sonhos.

Ao meu marido, Belmar, por todo amor, confiança, companheirismo além do apoio e incentivo desde o início ao fim deste trabalho.

Aos meus filhos Cecília e Arthur que mesmo pequeninos sempre estiveram ao meu lado, Arthur que passou 9 meses dessa jornada na barriga da mamãe e a Cecília que sempre ficava ao meu lado querendo saber o que a mamãe fazia no computador.

Aos meus orientadores, prof^ª. Eunice e prof. Marcelo agradeço a atenção, dedicação. Obrigada pela imensa ajuda prestada, sem vocês não teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu bolsista Leonardo, que no meio desta caminhada veio abraçar meu projeto como se fosse seu. Agradeço imensamente sua ajuda e dedicação.

A Rosi e a Sandy que nas dificuldades sempre estavam por perto para amparar e ajudar.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Resumo da Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus helveticus* POR *SPRAY DRIER* E APLICAÇÃO EM CHOCOLATE BRANCO

Najara Pinto Ribeiro Barro

Março, 2021.

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Eunice Valduga

Prof. Dr. Marcelo Mignoni

Resumo

As novas tendências de mercado apontam que o consumidor está interessado em consumir um produto que além de sabor agradável, também apresente algum benefício para a saúde. Inúmeros estudos têm mostrado os benefícios do consumo de chocolate. Nesse sentido, esse trabalho tem por objetivo desenvolver um chocolate branco adicionado de probiótico (*L. helveticus*) livre e microencapsulado. O presente estudo visa avaliar diferentes matrizes (Quitosana, gelatinas, maltodextrina, goma arábica, leite em pó, trealose, frutooligosacarídeo, amido) e proporções a serem utilizadas no encapsulamento do probiótico e no chocolate branco bem como condições ideais de *spray-drier*. Na primeira etapa do trabalho, testamos diferentes agentes encapsulantes e definimos os parâmetros de secagem. Na segunda etapa, foram elaboradas amostras de chocolate branco adicionadas dos probióticos nas formas livre ou encapsulada por *spray drier*. Selecionada as matrizes com melhor desempenho avaliou-se a resistência do probiótico livre e encapsulado no chocolate branco em diferentes períodos de armazenamento (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 100 dias) a 25 °C e resistência do probiótico encapsulado sob diferentes condições de stress ao pH (2 a 7), NaCl (3 a 9%), sacarose (10 a 45%) e temperatura (50 °C). A resistência do *L. helveticus* encapsulado em pH 2,0 foi de aproximadamente 96% após 3 h de incubação, a matriz CPM2 foi efetiva para a proteção do probiótico, especialmente para o pH 2,0 que foi a condição mais drástica para o probiótico, a taxa de sobrevivência foi de aproximadamente 96%. No pH 4,5 e 7,0 o probiótico demonstrou estabilidade após 3h de incubação, com taxa de sobrevivência superior a 98%. O efeito do cloreto de sódio (NaCl) nas contagens das populações mantiveram-se praticamente estáveis sem reduções consideráveis. As populações de probiótico encapsulado na matriz CPM2 em meio contendo 9% de NaCl reduziram aproximadamente 0,4 log UFC/g das células viáveis, demonstrando que a matriz protege o probiótico nessas condições. A encapsulação foi eficiente para manter as contagens das populações do probiótico na concentração de 10% e 25% já em alta concentração de sacarose (45%), a redução da contagem das populações de probiótico foi maior de aproximadamente 1 log UFC/g. Entretanto, mesmo após 3 h de incubação a redução foi superior a 7 log UFC/g. As maiores taxas de sobrevivência *L. helveticus* foram de 88,93 e 66,7% na microcápsula CPM1 (Tratamento 8 - 50% maltodextrina: 50% goma arábica) com temperaturas do ar de secagem no *spray drier* de 70 e 80 °C e para a microcápsula CPM2 (Tratamento 9 - 30% leite em pó + 19% maltodextrina + 19% trealose + 20%

frutoligosacarídeo + 10% amido + 2% tween 0,1%) foram de 96,49 a 99,69%, nas temperaturas de 110 e 120 °C, respectivamente. As amostras de chocolate apresentaram aw abaixo de 0,6, pH entre 5,92 – 6,98, Portanto, demonstrou-se que o chocolate branco é uma ótima matriz alimentícia devido a sua composição e características físico-químicas para incorporação de probióticos.

Palavras chaves: Chocolate branco, probiótico, *spray drier*.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

MICROENCAPSULATION OF *Lactobacillus helveticus* BY SPRAY DRIER AND APPLICATION IN WHITE CHOCOLATE

Najara Pinto Ribeiro Barro

March, 2021.

Advisors: Prof^ª. Dr^ª. Eunice Valduga

Prof. Dr. Marcelo Mignoni

Abstract

The new market trends indicate that the consumer is interested in consuming a product that besides pleasant taste, also presents some benefit to health. Numerous studies have shown the benefits of chocolate consumption. In this sense, this work aims to develop a free and microencapsulated probiotic (*L. helveticus*) added white chocolate. The present study aims to evaluate different matrices (Chitosan, gelatins, maltodextrin, gum arabic, milk powder, trehalose, fructooligosaccharides, starch) and proportions to be used in probiotic encapsulation and white chocolate as well as ideal *spray-drier* conditions. In the first stage of the work, we tested different encapsulating agents and defined the drying parameters. In the second stage, white chocolate samples were elaborated from probiotics in free forms or encapsulated by *spray drier*. The best performing matrices were selected, the resistance of the free probiotic and encapsulated in white chocolate in different storage periods (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 100 days) at 25 °C and resistance of the probiotic encapsulated under different conditions of stress at pH (2 to 7), NaCl (3 to 9%), sucrose (10 to 45%) temperature (50 °C). The resistance of *L. helveticus* encapsulated at pH 2.0 was approximately 96% after 3 h of incubation, the CPM2 matrix was effective for the protection of the probiotic, especially for pH 2.0 which was the most drastic condition for the probiotic, the survival rate was approximately 96%. At pH 4.5 and 7.0 the probiotic showed stability after 3 h of incubation, with survival rate higher than 98%. The effect of sodium chloride (NaCl) on population counts remained virtually stable without considerable reductions. Probiotic populations encapsulated in the CPM2 matrix in a medium containing 9% NaCl reduced approximately 0.4 log UFC/g of viable cells, demonstrating that the matrix protects the probiotic in these conditions. Encapsulation was efficient to maintain the counts of probiotic populations at the concentration of 10% and 25% already in high sucrose concentration (45%), the reduction in the count of probiotic populations was greater than approximately 1 log UFC/g. However, even after 3 h of incubation the reduction was greater than 7 log UFC/g. The highest survival rates *L. helveticus* were 88.93 and 66.7% in the CPM1 microcapsule (Treatment 8 - 50 % maltodextrin: 50% arabic gum) with drying air temperatures in the spray drier of 70 and 80 °C and for the CPM2 microcapsule (Treatment 9 – 3 0% milk powder + 19% maltodextrin + 19% trehalose + 20% fructooligosaccharide + 10% starch + 2% tween 0.1%) were from 96.49 to 99.69%, at temperatures of 110 and 120 °C,

respectively. The chocolate samples showed aw below 0.6, pH between 5.92 – 6.98, therefore, it was shown that white chocolate.

Key words: White chocolate, probiotics, spray drier.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de temperagem do chocolate.	25
Figura 2. Esquema resumido do procedimento realizado nos ensaios para preparo do probiótico para encapsulamento.....	47
Figura 3. Aspecto geral do spray dryer utilizado da matriz encapsulante e/ou probiótico/matriz encapsulante (a) e representação esquemática dos componentes (b).	48
Figura 4. Processo de fabricação de chocolate.	52
Figura 5. Termograma de Calorimetria Diferencial de Varredura das microcápsulas compostas por goma arábica-maltodextrina/ <i>L. helveticus</i> e por goma arábica-maltodextrina, após a secagem em <i>spray drying</i> a 70 °C.	65
Figura 6. Termograma de termogravimetria das microcápsulas do complexo goma arábica-maltodextrina/ <i>L. helveticus</i> e do complexo goma arábica-maltodextrina submetidos a secagem por <i>spray drying</i> a 70 °C.....	66
Figura 7. Micrografias eletrônicas das microcápsulas do complexo goma arábica-maltodextrina (M1)/ <i>L. helveticus</i> (aglomerado de microcápsulas de 20µm (a), 10µm (b) e 1µm (c)) e do complexo goma arábica-maltodextrina (100µm (d), 10µm (e) e 1µm (f)).	68
Figura 8. Micrografias eletrônicas das microcápsulas do complexo 30% leite em pó + 19% maltodextrina + 19% trealose + 20% frutoligossacarídeo + 10% amido + 2% tween 0,1% (M2) / <i>L. helveticus</i> (aglomerado de microcápsulas de 200µm (a), 100µm (b) e 20µm (c)).	68
Figura 9. Chocolate branco formulado com probiótico <i>L. helveticus</i> livre (a) e encapsulado (b).	73
Figura 10. Cinéticas de sobrevivência para o <i>L. helveticus</i> livre – CPL (a) e encapsulado na matriz M1-CPM1 (b) e M2-CPM2 (c).	83
Figura 11. Análise dos Componentes Principais (ACP) das amostras de chocolate branco, sem probiótico, adicionado de probiótico livre e encapsulado (Matriz M1 e M2) no 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 100 dia de armazenamento, respectivamente.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças entre os tipos de chocolate mais comercializados.	28
Tabela 2. Aplicações de probióticos em alimentos e bebidas.	35
Tabela 3. Condições operacionais do <i>spray dryer</i>	49
Tabela 4. Tratamentos realizados para escolha da matriz encapsulante para aplicação em chocolate branco.	57
Tabela 5. Taxa de sobrevivência do <i>L. helveticus</i> encapsulado na matriz M1 após secagem por <i>spray dryer</i>	58
Tabela 6. Temperaturas de secagem em <i>spray drier</i> e taxas de sobrevivência do probiótico encapsulado em matriz CPM1 e CPM2.	60
Tabela 7. Condições de secagem em <i>spray drier</i> e resposta em atividade de água (A_w) e umidade (%) das microcápsulas com probiótico (Ensaio 3 e 6).	62
Tabela 8. Resistência do probiótico (log UFC/g) encapsulado na matriz CPM2 sob diferentes condições de stress ao pH, NaCl e sacarose após 3 h de incubação.	69
Tabela 9. Resistência do probiótico (log UFC) encapsulado na matriz CPM2 incubado a 50 °C por 30 e 60 min.	72
Tabela 10. Atividade de água do chocolate branco sem probiótico, com probiótico encapsulado com a matriz M1 e a matriz M2 e na forma livre.	74
Tabela 11. Umidade do chocolate sem probiótico, com probiótico encapsulado com as matrizes M1 e M2 e na forma livre.	75
Tabela 12. pH do chocolate sem probiótico, com probiótico encapsulado e na forma livre.	77
Tabela 13. Acidez do chocolate sem probiótico, com probiótico encapsulado nas matrizes M1 e M2 e na forma livre.	78
Tabela 14. Índices de cor L^* , a^* , b^* e croma C do chocolate sem probiótico (CSP), com probiótico encapsulado nas matrizes M1 (CPM1) e M2 (CPM2) e na forma livre (CPL).	79
Tabela 15. Avaliação da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado em amostras de chocolate branco durante a estocagem a 25°C.	80
Tabela 16. Parâmetros α e β do modelo de Weibull de sobrevivência do <i>L. helveticus</i> livre (CPL) e encapsulado na matriz M1 (CPM1) e M2 (CPM2) e análise estatística do ajuste (R^2).	82
Tabela 17. Matriz de correlação (r) de Pearson para as variáveis atividade de água (a_w), umidade, pH, acidez, cor L^* e croma C^* e contagem do probiótico do chocolate branco, sem	

probiótico, adicionado de probiótico livre e encapsulado (Matriz CPM1 e CPM2) no 0°, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 100 dia de armazenamento. 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABICAB	Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
ATG	Análise Termogravimétrica
Aw	Atividade de água
BOPP	Filme Polipropileno Biorientado
BAL	Bactérias ácido lácticas
CPL	Chocolate com Probiótico Livre
CPM1	Chocolate com Probiótico encapsulado na matriz M1
CPM2	Chocolate com Probiótico encapsulado na matriz M2
CSP	Chocolate Sem Probiótico
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FAO	Organização da Agricultura e Alimentação das Nações Unidas
HCl	Ácido clorídrico
LB	Luria Bertani
MEV	Microscopia de varredura eletrônica
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
M1	Matriz de encapsulamento 1
M2	Matriz de encapsulamento 2
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
PGPR	Polirricinoleato de poliglicerol
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	Organização Mundial de Saúde
W/O	Água em óleo
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Desenvolvimento de produto	21
3.2 Chocolate	22
3.2.1 Processamento do chocolate.....	23
3.2.1.1 Mistura dos ingredientes.....	23
3.2.1.2 Refino	24
3.2.1.3 Conchagem	24
3.2.1.4 Temperagem	24
3.2.1.5 Moldagem do chocolate.....	26
3.2.1.6 Embalagem	26
3.2.1.7 Armazenamento do chocolate	27
3.2.2 Tipos de Chocolate	27
3.3 Alimentos Funcionais	30
3.3.1 Propriedades funcionais do chocolate	30
3.3.2 Probióticos	31
3.4 Microencapsulação	33
3.4.1 Encapsulação de probióticos	34
3.4.2 Agentes encapsulantes	36
3.4.3 Principais métodos de encapsulação.....	38
3.4.3.1 <i>Spray Drying</i> (Atomização).....	39
3.4.3.2 <i>Spray cooling</i>	40
3.4.3.3 <i>Spray coating</i>	40
3.4.3.4 Extrusão	41
3.4.3.5 Emulsão	41
3.4.3.6 Coacervação complexa	42
3.4.3.7 Gelificação iônica	42
3.5 Considerações finais ao estudo da arte	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44

4.1 Materiais.....	44
4.2 Métodos.....	44
4.2.1 Definição de matriz encapsulante.....	44
4.2.2 Preparo do probiótico para encapsulamento.....	45
4.2.3 Encapsulamento por Spray Dryer.....	48
4.2.3.1 Definição parâmetros de secagem.....	48
4.2.3.2 Encapsulamento do probiótico e secagem.....	49
4.2.4 Formulação de chocolate com adição do probiótico.....	51
4.2.5 Avaliação da resistência do probiótico encapsulado sob diferentes condições de stress ao pH, NaCl, sacarose e temperatura.....	52
4.2.6 Avaliação da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado em amostras de chocolate branco durante a estocagem a 25 °C.....	53
4.2.7 Determinações Analíticas.....	53
4.2.7.1 pH.....	54
4.2.7.2 Atividade de água (Aw).....	54
4.2.7.3 Umidade.....	54
4.2.7.4 Acidez.....	54
4.2.7.5 Cor.....	54
4.2.8 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	55
4.2.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	55
4.2.10 Análise Termogravimétrica (ATG).....	55
4.3 Contagem do micro-organismo probiótico.....	55
4.4 Análise estatística.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Microencapsulamento.....	57
5.1.1 Matriz encapsulante.....	57
5.1.2 Eficiência do encapsulamento.....	58
5.1.3 Caracterização das microcápsulas.....	62
5.1.3.1 Atividade Água (Aw) e Umidade.....	62
5.1.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	64
5.1.3.3 Análise termogravimétrica (ATG).....	66
5.1.3.4 Caracterização Morfológica (MEV).....	67
5.1.3.5 Resistência do probiótico encapsulado na matriz CPM2 sob diferentes condições de stress ao pH, NaCl, sacarose e temperatura.....	69

5.2	Formulação de chocolate branco com probiótico	73
5.3	Caracterização do chocolate	73
5.3.1	Atividade Água (Aw)	74
5.3.2	Umidade	75
5.3.3	pH	76
5.3.4	Acidez	77
5.3.5	Índices de cor L*	78
5.4	Avaliação da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado em amostras de chocolate branco durante a estocagem a 25 °C	80
5.5	Análise multivariada do chocolate: Correlação de Pearson e Análise dos Componentes Principais (ACP)	84
6	CONCLUSÃO	86
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
8	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICES	101
	Apêndice A: Questionário Anônimo de Análise Sensorial	101
	Apêndice B: Artigo publicado	102

1 INTRODUÇÃO

Com a introdução de novos alimentos, cada vez mais os consumidores tornam-se exigentes e demandam novas necessidades para as indústrias alimentícias. As novas tendências mundiais no mercado de chocolate, bem como a crescente busca dos consumidores por produtos diferenciados começam a demandar inovações e a produção de alimentos, com forte apelo voltado a saudabilidade, juntando a indulgência do chocolate com a presença de algum ingrediente que traga ao consumidor algum benefício à saúde. Acredita-se que a formulação de um novo produto com propriedades funcionais possa atrair novos consumidores, bem como seu espaço no mercado, com o público alvo voltado a pessoas que desejam cuidar da saúde e também não deixar de lado o prazer de saborear um doce.

O mercado de chocolates tem proporcionado a diversificação de sabores, texturas e incorporação de ingredientes, como alternativa de ingredientes tem-se os micro-organismos probióticos, ainda pouco explorados neste mercado, sendo um dos motivos a grande dificuldade de mantê-los viáveis durante o armazenamento do produto.

O chocolate branco é um produto com pouco apelo de saudabilidade pois, em sua composição não temos a presença do líquido de cacau, o que as vezes deixa de ser um produto atrativo mas com a adição de ingredientes que possam agregar funcionalidade ao produto o mesmo torna-se mais atrativo comercialmente.

De acordo com o documento “Brasil Food Trends 2020” a tendência para o mercado de alimentos no Brasil é o desenvolvimento de formulações com o conceito de saudabilidade, ou seja, produtos com menor valor calórico, menor teor de gordura, redução de açúcar e que possuam propriedades funcionais (MADI et al., 2010).

A inovação é fundamental para o desenvolvimento de qualquer empresa. No setor de alimentos não é diferente, e cada vez mais os consumidores desejam consumir novos produtos que consigam aliar sabor, nutrição, qualidade e segurança.

Segundo Bampi et al. (2016), dentre os alimentos funcionais, os adicionados de micro-organismos probióticos vêm conquistando o mercado alimentício devido à seus diversos benefícios a saúde, sendo os micro-organismos probióticos do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os mais utilizados. No entanto, fornecer e manter a quantidade mínima necessária de células probióticas viáveis (10^6 a 10^7 UFC / g), para conferir quaisquer efeitos positivos à saúde, é um grande desafio, considerando sua sensibilidade ao processamento e armazenamento. Além disso, a incorporação de microrganismos probióticos vivos em produtos alimentares também apresenta problemas, principalmente devido à suscetibilidade do

probiótico a vários fatores, como temperatura, oxigênio, atividade de água e estresse mecânico de pressão osmótica, valor de pH, etc. (MOHAMMADI et al., 2011; RODRIGUES et al., 2020).

Desta forma, faz-se necessário agregar técnicas para garantir a sobrevivência destes micro-organismos durante o *shelf life* dos diferentes tipos de produtos onde os mesmos são aplicados. A secagem por pulverização é o método potencial, principalmente pois possibilita modificar as condições operacionais durante a secagem por pulverização, para controlar o tamanho e a forma das partículas. A microencapsulação é um método promissor para proteger as células probióticas contra as condições adversas que podem enfrentar (SILVA et al., 2020; ETCHEPARE et al., 2020).

Entre as muitas técnicas de microencapsulação, a secagem por *spray drier* é uma das mais interessantes devido ao seu baixo custo, potencial de grande escala, alta estabilidade probiótica e baixa quantidade de degradação durante a secagem se o processo de secagem e os parâmetros da formulação foram otimizados corretamente (AREPALLY et al., 2020; HADZIEVA, et al., 2017).

A indústria alimentícia passa por intensa competitividade e evolução, o que traz oportunidades para criar e inovar. Baseado neste conceito, o chocolate que é um produto mundialmente conhecido e apreciado torna-se uma possibilidade de agregação de valor e funcionalidade a esse produto.

Atualmente o Brasil é o 4º colocado em consumo de alimentos saudáveis no ranking global e movimenta US\$ 35 bilhões por ano, de acordo com uma pesquisa realizada pela Euromonitor no ano de 2019. Segundo a agência internacional de pesquisa de mercado, nos últimos cinco anos, o crescimento do setor de alimentos e bebidas saudáveis foi, em média, de 12,3% ao ano e em 2019, atingiu crescimento de 50%, movimentando R\$ 110 milhões.

O probiótico *Lactobacillus helveticus* é geralmente reconhecido como seguro (GRAS). É normalmente usado como uma cultura inicial na fabricação de queijos semiduros, produtos lácteos fermentados ou aditivos alimentares devido principalmente ao seu potencial com efeito anti-hipertensivo (ZHOU et al., 2019; CAVALHEIRO et al., 2020). No entanto, raros são os estudos na literatura que avaliaram o encapsulamento de *L. helveticus*. Neste sentido, o presente estudo avaliou diferentes materiais de parede na encapsulação do probiótico por *spray-dryer*, a caracterização das microcápsulas formadas e a potencialidade de aplicação em uma matriz de chocolate branco. Com o intuito de atender este nicho de mercado, o desenvolvimento de um chocolate adicionado de probiótico (*L. helveticus*) vem de encontro ao anseio dos consumidores que buscam em um alimento funcionalidade, bem como satisfazer seus anseios e necessidades nutricionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do estudo foi desenvolver um produto inovador, chocolate branco adicionado de probiótico (*L. helveticus*) livre e microencapsulado.

2.2 Objetivos Específicos

- Definir os materiais de parede (quitosana, gelatinas, maltodextrina, goma arábica, leite em pó, trealose, frutoligossacarídeo, amido) e proporções a serem utilizadas no encapsulamento do probiótico e no chocolate branco;
- Investigar os efeitos da matriz encapsulante e das condições operacionais da secagem por *spray dryer* na viabilidade do probiótico;
- Caracterizar as microcápsulas com o probiótico em termos de umidade, atividade água, tamanho, análise termogravimétrica (ATG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), distribuição e morfologia das partículas;
- Analisar a resistência do probiótico livre e encapsulado sob diferentes condições de pH, NaCl, sacarose e temperatura;
- Elaborar formulação de chocolate branco adicionado de probiótico livre e encapsulado em matrizes padronizadas;
- Avaliar a resistência do probiótico livre e encapsulado no chocolate branco em diferentes períodos de armazenamento (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 100 dias) a 25 °C;
- Estudar os efeitos do probiótico livre e encapsulado em matrizes padronizadas nas características físico-químicas do chocolate branco armazenado a 25 °C.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão abordados aspectos gerais da literatura referentes ao desenvolvimento de produto, chocolates, alimentos funcionais, probióticos, agentes encapsulantes, bem como métodos de encapsulamento.

3.1 Desenvolvimento de produto

No mundo globalizado, cada vez mais os consumidores buscam por produtos mais atrativos e inovadores, não basta mais o tradicional, as empresas precisam muitas vezes se reinventar. Para tanto, os projetos de pesquisa e desenvolvimento de produtos são fundamentais para a sobrevivência das mesmas no mercado. A vantagem competitiva de uma empresa está diretamente relacionada à sua capacidade de introduzir no mercado novos produtos e serviços bem como garantir a sobrevivência dos mesmos. O desenvolvimento de novos produtos alimentícios se torna cada vez mais desafiador, à medida que se procura atender à demanda dos consumidores por produtos que sejam saudáveis e atrativos (KOMATSU et al., 2008).

Segundo Bampi et al. (2016), as novidades são mais atraentes aos consumidores do que a tradição das marcas, sendo este fato que aumenta ainda mais a competitividade na área de alimentos. No entanto, lançamentos de novos produtos devem ser projetados e analisados minuciosamente, pois muitos resultam em fracasso, geralmente por falha em alguma(s) etapa(s) do processo de desenvolvimento e/ou lançamento do produto.

As mudanças constantes do mercado caracterizado pela redução do ciclo de vida dos produtos e o rápido desenvolvimento tecnológico tem constituído poderosa combinação no sentido de acelerar fortemente a geração de novos produtos na maioria das empresas (BRAGANTE, 2015).

De acordo com Rozenfeld et al. (2006), o desenvolvimento de produtos é um processo cada vez mais crítico devido a globalização dos mercados, o aumento da diversidade de produtos e a redução do ciclo de vida dos mesmos, sendo assim novos produtos buscam atender segmentos específicos de mercado, incorporando novas tecnologias e processos.

Inúmeras pessoas associam o consumo do chocolate com a sensação de prazer, consumindo o chocolate em diferentes momentos. Este fator se justifica devido à serotonina e feniletilamina, substâncias envolvidas com a excitação dos órgãos e pelo sentimento de euforia e êxtase, que são liberadas quando se consome o chocolate (ANDRADE et al., 2003).

3.2 Chocolate

O chocolate pode ser definido como uma suspensão de partículas sólidas composta principalmente de açúcar e cacau, envolvidas pela matriz lipídica da manteiga de cacau. Portanto, a manteiga de cacau representa a fase contínua do chocolate, sendo a matriz dispersante para as partículas sólidas do cacau, açúcar e outros ingredientes (LOPES, 2015). Deve fundir rápido e completamente em temperatura próxima à do corpo humano, caso contrário, poderá promover um pobre desprendimento de aroma/sabor e, provavelmente, um residual ceroso (VISSOTTO et al., 1999). Os principais tipos, chocolate escuro, ao leite e branco diferem principalmente no conteúdo de sólidos do cacau, gordura do leite e manteiga de cacau (HUSSAIN et al., 2020)

A legislação brasileira define chocolate como produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (pasta ou *líquor*) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo no mínimo 25% (m/m) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados. Chocolate branco é o produto obtido a partir da mistura de manteiga de cacau com outros ingredientes, contendo, no mínimo 20% (m/m) de sólidos totais de manteiga de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (BRASIL, 2005).

O chocolate é um alimento essencialmente energético, com calorias provenientes da manteiga e do açúcar. A composição do chocolate varia em todo o mundo devido a diferenças culturais e legislações. O conteúdo de cada nutriente depende, entre outros fatores, da porcentagem de cacau. Carboidratos representados principalmente como açúcares, têm um teor total de até 45%, e gordura, um teor total de até 30%. A composição também pode ser influenciada pela variedade genética dos grãos de cacau que foram utilizados para a produção do chocolate, condições de cultivo e técnicas de pós-colheita. As matérias-primas básicas utilizadas na produção de chocolate amargo são o *líquor* ou massa de cacau refinada, a manteiga de cacau e o açúcar (sacarose), sendo que o leite e derivados lácteos são incluídos na produção de chocolate ao leite (REIS et al., 2020).

O chocolate branco não contém *líquor* de cacau, sendo elaborado apenas com açúcar, manteiga de cacau e leite. Além desses ingredientes básicos, também são utilizados nas formulações, emulsificantes e aromatizantes (VISSOTTO et al., 1999).

O comportamento físico, químico e reológico do chocolate é determinado pelas suas propriedades de escoamento, teor de gordura, distribuição do tamanho das partículas, teor de umidade e equipamentos utilizados na sua produção. Para que um chocolate possa ser

considerado de qualidade ele deve possuir uma superfície com brilho e ser duro e quebradiço na temperatura de 20 a 25 °C (*snap*). Deve fundir rápido e completamente na boca, acompanhado por uma sensação de frio e rápido desprendimento de aromas. Não deve apresentar residual ceroso e nem sensação de arenosidade durante a degustação. Em termos de processo, deve apresentar propriedades reológicas adequadas às linhas de produção e boas propriedades de contração durante o desmolde (LUCCAS, 2001).

Em 2020, a ABICAB publicou o balanço estatístico realizado semestralmente pela Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados onde mostra que a indústria brasileira responsável pela produção e exportação de produtos de chocolate segue entre os seis países que lideram o volume de vendas de chocolate no varejo, sendo que os Estados Unidos ocupam o primeiro lugar da lista seguido pela Rússia, Alemanha, Reino Unido, França e Brasil. Atualmente o Brasil exporta chocolates para mais de 124 países (ABICAB, 2020).

O faturamento do mercado de chocolates no Brasil, em 2020, foi de R\$ 13,3 bilhões. A indústria se concentra especialmente em São Paulo, mas há importantes produtores também na Bahia, no Espírito Santo, no Paraná e no Rio Grande do Sul. No mundo, a Suíça é o país que mais consome chocolate com cerca de 8,5 kg/ano por habitante, seguido da Áustria com 8,2 kg e Alemanha com 7,9 kg. O brasileiro consome por ano cerca de 2,4 kg de chocolate por habitante (ABICAB, 2020).

3.2.1 Processamento do chocolate

As matérias-primas básicas para a produção de chocolate são o *líquor* (obtido pelo refino da massa de cacau), a manteiga de cacau e o açúcar, podendo-se ou não adicionar leite e derivados lácteos. O processo tradicional de produção de chocolate envolve distintas etapas: mistura dos ingredientes, refino, conchagem, temperagem, moldagem, embalagem e armazenamento.

3.2.1.1 Mistura dos ingredientes

A etapa de mistura consiste na homogeneização dos ingredientes em pó (açúcar, leite em pó) com os ingredientes líquidos e semi-líquidos (manteiga de cacau e *líquor* de cacau fundidos), por tempo suficiente para se transformarem em uma massa plástica adequada para o

refino. Essa etapa é feita, em geral, em tachos encamisados a 40 °C, para garantir que a manteiga de cacau permaneça fundida (LUCCAS, 2001).

3.2.1.2 Refino

A etapa de refino é de grande importância no processamento do chocolate, pois reduz o tamanho das partículas dos ingredientes tornando-os imperceptíveis na boca durante a degustação do produto final. O teor de gordura influencia esta etapa, sendo que massas muito secas (com menores teores de gordura) são refinadas mais rapidamente, porém, apresentam tamanho de partículas mais elevado que o ideal. Por outro lado, um teor elevado de gordura faz com que a massa fique muito fluida, deslizando lentamente nos cilindros de refino. Dessa forma, permanece maior tempo nos cilindros, provocando diminuição excessiva do tamanho de partículas. Segundo Beckett (2009), a maioria das partículas da massa refinada deve ter até 40 µm, mas na prática, tamanhos maiores que 25 µm proporcionam arenosidade na boca ao degustar o chocolate, e por outro lado, tamanhos inferiores a 20 µm podem causar problemas tecnológicos, uma vez que levam ao aumento da viscosidade e do limite de escoamento, dificultando os processos posteriores.

3.2.1.3 Conchagem

Esta etapa tem como principais objetivos a volatilização de compostos indesejáveis formados durante a fermentação das sementes de cacau (ácidos como o acético), a diminuição da umidade proveniente dos ingredientes e, por outro lado, a formação de aromas desejáveis por reações como a de *Maillard*. A conchagem também é importante para a homogeneização dos ingredientes. Desta forma, são necessários, nesta etapa, o cisalhamento da massa, agitação e aquecimento entre 50 e 70 °C, dependendo do tipo de chocolate desejado (ao leite, branco ou amargo). Quanto maior o tempo de conchagem, maior é a formação do sabor desejável do chocolate. Por isso, no método tradicional, esta etapa pode levar de 8 a 96 h, dependendo do tipo de produto que se deseja e do equipamento que se dispõe (BECKETT, 2009).

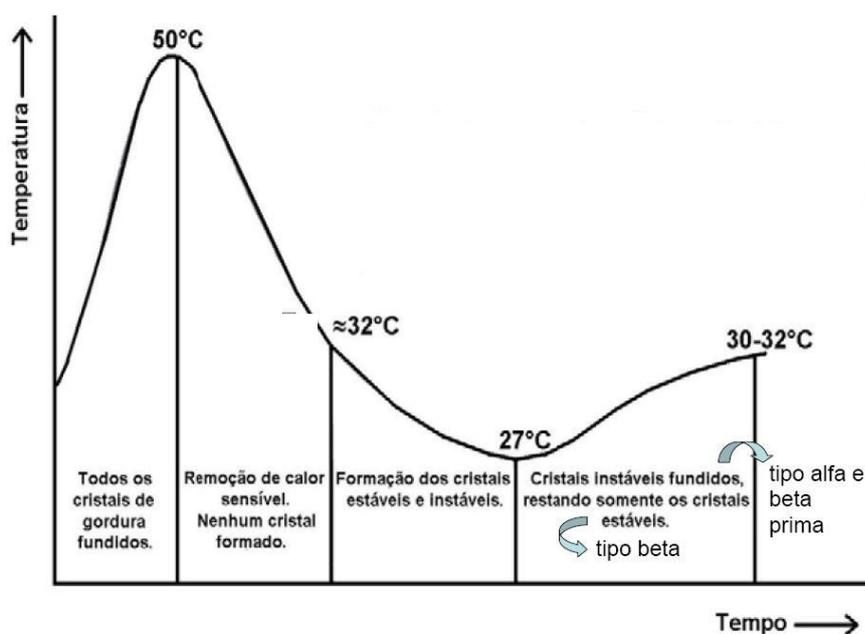
3.2.1.4 Temperagem

Devido à natureza polimórfica da manteiga de cacau, o chocolate deve ser pré-cristalizado ou temperado antes das etapas de moldagem ou de recobrimento. A temperagem é

uma etapa de processamento que consiste na indução a formação de núcleos de cristais do tipo beta (V), de maior estabilidade termodinâmica (DHONSI e STAPLEY, 2006), influenciando de forma positiva as características de qualidade do produto final como dureza e quebra a temperatura ambiente (*snap*), fusão na boca, brilho, contração durante a desmoldagem e rápida liberação de sabor durante a degustação (EFRAIM, 2009).

As diferentes etapas envolvidas no processo de temperagem do chocolate ao leite estão descritas na Figura 1.

Figura 1. Curva de temperagem do chocolate.



Fonte: LUCCAS (2001).

Segundo Luccas (2001), o processo de temperagem pode ser dividido em três etapas: na primeira etapa o chocolate é derretido a 45-50 °C com o objetivo de destruir qualquer forma cristalina presente. Em seguida, é realizado um resfriamento lento, sob movimentação constante da massa, até a temperatura de cristalização, que deve ser adequada para o crescimento de cristais do Tipo V. Nesta etapa, também se formam cristais instáveis, ou metaestáveis. A terceira e última etapa consiste em elevar a temperatura do chocolate o suficiente para ocorrer a fusão dos cristais instáveis, conferindo ao chocolate propriedades reológicas adequadas para moldagem ou recobrimento.

3.2.1.5 Moldagem do chocolate

O objetivo desta operação é dar forma à pasta, colocando-a em moldes que formatarão aos diferentes tipos de chocolate (BASTOS, 2003).

O trabalho de moldagem, nas indústrias modernas, é realizado mecanicamente e em cadeia por um grupo completo de equipamentos consecutivos interligados. O chocolate moldado é o resultado de quatro fases do procedimento. Na primeira os moldes são aquecidos automaticamente e envasados, fazendo um percurso na câmara aquecida para deixar o chocolate no ponto antes de chegar à recheadora. Este é um ponto muito importante, pois no caso de o chocolate ser colocado nos moldes a frio, torna-se muito aderido e quase impossível de desmoldar (BECKETT, 1994; OETTERER, REGINATO-D'ARCE e SPOTO, 2006).

A retirada de ar do tableteador define a segunda fase, seguida da terceira fase que consiste no resfriamento da câmara contínua e apropriada com boa ventilação. A quarta fase, definida como final é onde ocorre a desmoldagem ou retirada dos chocolates dos tabletes já prontos para a embalagem, que é realizada automaticamente conforme as características específicas de cada tipo de chocolate (BECKETT, 1994; OETTERER, REGINATO-D'ARCE e SPOTO, 2006).

3.2.1.6 Embalagem

Independentemente do tipo de chocolate que se deseja embalar, todas as embalagens devem apresentar barreira contra vapor d'água, passagem da luz, além de não permitir a passagem de componentes de aroma do próprio chocolate ou de odores provenientes do ambiente de estocagem. A embalagem deve suportar as solicitações mecânicas do sistema de transporte e distribuição e ser resistente à ataques de insetos e roedores. A seguir apresentam-se os tipos de embalagens mais usadas para diferentes tipos de chocolate (BASTOS, 2003; NACHTIGALL, 1999):

- Barras de chocolate de 30 a 100 g: são usadas embalagens com estrutura de polipropileno biorientado, com sistema de selagem a frio.
- Barras de chocolate com mais de 100 g: usa-se envoltórios internos de alumínio termosselado, conferindo proteção ao chocolate, externamente coberto por papel.
- Bombons de chocolate: as embalagens utilizadas para bombons são compostas por polipropileno biorientado, com fechamento tipo torção.

3.2.1.7 Armazenamento do chocolate

O chocolate deve ser armazenado em locais secos e bem arejados, com temperaturas entre 20 °C e 22 °C e umidade relativa entre 45 % e 60 %, sem exposição ao sol ou luminosidade (BECKETT, 2009).

A estabilidade deste produto durante o armazenamento está ligada à manteiga de cacau, um dos ingredientes mais importantes na formulação do chocolate (COHEN et al., 2004). Portanto, a temperatura do ambiente de armazenamento é de total importância, visto que se, por exemplo, se o chocolate for armazenado a temperaturas próximas a 20 °C o conteúdo de gordura tende a difundir para a superfície do produto, cristalizando e causando um aspecto farinhoso branco, conhecido por *fat bloom*. Pode ocorrer também o fenômeno *sugar bloom*, quando a água se condensa na superfície do chocolate causando a dissolução do açúcar interior. Com a evaporação da água condensada o chocolate fica com uma camada branca superficial de pequenos cristais de açúcar, deixando o produto com aspecto desagradável (BASTOS, 2003; OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006).

3.2.2 Tipos de Chocolate

Os tipos de chocolate variam de acordo com os ingredientes adicionados, sua forma e a mistura de cacau utilizada. Se não for adicionado à massa de cacau tem-se o chocolate branco, o qual é constituído apenas de manteiga de cacau com açúcar, emulsificantes e aromatizantes. No chocolate meio amargo não é adicionado leite. Se for substituído a manteiga de cacau por gordura hidrogenada, menos onerosa, tem-se o *compound*, que pode ser usado como cobertura de bolos e sorvetes, mas se for vendido como chocolate é considerado fraude. Entre as várias formas apresentadas ao consumidor, tem-se o chocolate ao leite ou amargo em tabletes, adicionados de amêndoas, castanha, amendoim, uva-passa e similares, bombons recheados com vários tipos de componentes (OETTERER et al., 2006).

Na Tabela 1, pode-se observar de forma resumida as principais diferenças entre os tipos de chocolates comercializados.

Tabela 1. Diferenças entre os tipos de chocolate mais comercializados.

Tipo de chocolate	Ingredientes utilizados	Teor de massa de cacau (%)
Branco	Açúcar, manteiga de cacau, leite em pó e lecitina	-
Ao leite	Açúcar, massa e manteiga de cacau, leite em pó e condensado	20 a 39
Meio amargo	Massa e manteiga de cacau, pouco açúcar	40 a 55
Amargo	Massa e manteiga de cacau, pouco açúcar	56 a 85

Fonte: FARAH (2008)

Verifica-se na Tabela 1 que os tipos de chocolate variam de acordo com os ingredientes adicionados. O teor de massa de cacau é determinante para diferenciar um produto de outro, pois conforme aumenta o percentual de massa de cacau mais amargo é o produto final.

Na definição de Vercet (2003), o chocolate branco é composto de açúcar, sólidos de leite, manteiga de cacau, lecitina de soja e vanilina, conforme descritos a seguir.

a) Açúcar

A sacarose é um dissacarídeo constituído dos monossacarídeos glicose e frutose quimicamente ligados. Entretanto, esta ligação pode ser clivada hidroliticamente por ácidos ou pela enzima invertase (β -D-frutofuranosidase). A mistura resultante constituída de partes iguais de glicose e frutose é chamada açúcar invertido. Existem também muitos outros tipos de açúcares, tais como os monossacarídeos glicose e frutose, o dissacarídeo lactose, assim como os poliálcoois, por exemplo, sorbitol e xilitol. Todavia, a sacarose é, sem dúvida, o tipo de açúcar mais importante para a produção de chocolate (MELO, 2008).

É responsável pelo sabor doce e pelo agente de corpo dos produtos. Muitos produtos de confeitaria utilizam as propriedades especiais de solubilidade e cristalização da sacarose, sozinha ou combinada com outros “açúcares”, tais como xarope de glicose (xarope de milho) e açúcar invertido (LANNES e RICHTER, 2007).

No chocolate, os açúcares cumprem funções importantes que vão além do adoçante, como agente de volume, modificador de textura, intensificador de sabor e conservante (VILLA et al., 2020).

b) Manteiga de Cacau

Uma mistura de sementes de cacau moídas não produziria por si só o chocolate sólido tão familiar ao consumidor moderno. Ao invés disso, geraria um produto muito duro que não seria agradável ao paladar. A fim de permitir que ele derreta facilmente é necessário o emprego de gordura adicional. Isto pode ser obtido pela prensagem das sementes de cacau e remoção de parte do conteúdo de gordura, chamada manteiga de cacau. Esta extração de gordura possui uma dupla vantagem, a primeira é que a gordura obtida é usada para produzir barras sólidas de chocolate, e a segunda é que o pó de cacau com menos gordura remanescente pode ainda ser incorporado em uma bebida (BECKETT, 1994).

c) Leite em pó

Leite e produtos à base de leite são ingredientes muito importantes devido às suas propriedades nutricionais, sensoriais e de processamento. Uma das suas aplicações principais é na fabricação de chocolate. O chocolate ao leite se transformou em um produto muito popular em razão da sua mistura única de sabores de cacau e leite. Devido ao progresso no moderno processamento de alimentos, os ingredientes à base de leite podem ser produzidos em diversas composições. Isto inclui pós especiais fabricados com leite integral, leite desnatado e manteiga, e também vários componentes e misturas destes, incluindo soro e proteínas de leite. A disponibilidade desta grande gama de produtos aumentou muito o uso de ingredientes à base de leite, especialmente em alimentos de conveniência e dietéticos e na produção de chocolate (MELO, 2008).

d) Emulsificantes

A adição de agentes emulsificantes visa à redução final na viscosidade durante a conchagem, sendo considerados constituintes muito importantes do chocolate. Os emulsificantes mais utilizados são a lecitina e o poliglicerol polirricenoleato (PGPR), sendo que é amplamente aceito que uma parte de lecitina comercial pode substituir 9 ou 10 partes de manteiga de cacau (MELO, 2008).

e) Vanilina

A vanilina, 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído, é tradicionalmente conhecida como aroma de baunilha. É um composto cristalino de cor branca, solúvel em clorofórmio e éter, e é adicionada para realçar o sabor, ao invés de mascará-lo. Atualmente é utilizada na forma

metilada ou etilada e o nível de adição varia entre 0,06 e 0,09 % por batelada de chocolate (MELO, 2008).

3.3 Alimentos Funcionais

O termo “alimentos funcionais” foi inicialmente introduzido pelo governo do Japão em meados dos anos 1980, como o resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (STRINGHETA et al., 2007).

Não existe um conceito único mundialmente reconhecido para alimentos funcionais, cada país de acordo com sua regulamentação apresenta sua definição. No Brasil, não tem um conceito para alimento funcional, pois a legislação brasileira define apenas alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde. Sendo que a propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. E a alegação de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999).

O Brasil (BRASIL, 2008), reconhece até o momento as seguintes alegações de propriedades funcionais aprovadas: ácidos graxos, carotenoides, fibras alimentares, fitoesteróis, proteína de soja, polióis e probióticos. Existem diversos tipos de alimentos funcionais, porém os que recebem maior destaque são os probióticos, os prebióticos e os simbióticos (SAAD et al., 2011).

3.3.1 Propriedades funcionais do chocolate

Durante muitos anos o chocolate foi considerado uma simples guloseima, com elevado teor de calorias que, se consumido em excesso, poderia contribuir com a obesidade e ser prejudicial à pele. Estes tipos de afirmações despertaram a curiosidade de cientistas e pesquisadores que passaram a interessar-se mais pelo assunto e investigar até que ponto isto seria verdade ou não (NACHTIGALL, 1999). Diversos efeitos benéficos estão associados ao consumo de chocolate, como a diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares pelos mecanismos de redução da pressão sanguínea (SILVA, 2016).

Estudos comprovam que o chocolate somente pode ser prejudicial à pele, no caso de pessoas que apresentam predisposição genética, pois o cacau apresenta uma proteína muito

sensibilizante que pode provocar urticária, manchas no corpo e inchaço nas pálpebras. Porém casos como este são muito raros (NACHTIGALL, 1999).

Além de ser indescritivelmente saboroso, o chocolate é um dos alimentos mais completos já inventados pelo homem. Uma barra de 100 g contém, aproximadamente: 528 quilocalorias, 4,4 g de proteínas, 94 g de cálcio, 142 mg de fósforo, 1,4 mg de vitamina A, 0,02 mg de vitamina B1 e 0,14 mg de vitamina B2 (LANNES e RICHTER, 2007).

Durante uma década, pesquisas têm demonstrado que o chocolate pode ser um alimento muito benéfico, que deve ser introduzido, em quantidades adequadas, ao cardápio diário. O cacau, principal componente do chocolate, é extraordinariamente rico em um composto muito encontrado em vinhos tintos e chás, os flavonoides. Este grupo de antioxidantes pertence a uma ampla e diversa classe de fitoquímicos chamados polifenóis (LANNES e RICHTER, 2007).

As sementes de cacau da variedade Forastero são as mais ricas em compostos fenólicos, representando em média 15 a 20% de seu peso seco e desengordurado, sendo que 60% pertencem à classe dos flavonoides (EFRAIM, 2004).

A quantidade de flavonoides no chocolate industrializado é dependente da colheita de grãos e condições de processo subsequentes usado pelos fabricantes de chocolate. Durante a etapa de fermentação são perdidos, em média, 70% dos flavonoides, devido a importantes reações bioquímicas que ocorrem principalmente pela diminuição do pH, aumento de temperatura e atuação de certas enzimas presentes no fruto. Tais reações são, em parte, responsáveis pela redução do amargor e da adstringência melhorando assim o desenvolvimento do sabor do chocolate (EFRAIM, 2004).

3.3.2 Probióticos

O termo "probiótico" tem origem grega e significa "para a vida" (STEFE et al., 2008). Lilley & Stillwell, em 1965, usaram a palavra probiótico, pela primeira vez, ao se referir a uma substância excretada por um micro-organismo que estimulava o crescimento de outro (BARBOSA et. al., 2006). PARKER, em 1974, foi o primeiro a utilizar o termo probiótico com o sentido empregado atualmente e definiu probióticos como “organismos ou substâncias os quais contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal” (COPPOLA et al., 2004).

Segundo BADARÓ et al. (2009) os probióticos são micro-organismos vivos que, quando integrados na alimentação, são classificados de alimentos funcionais por beneficiarem a saúde do hospedeiro com risco reduzido de causar doença no consumidor. Probióticos são micro-organismos vivos que oferecem a seu hospedeiro vários benefícios à saúde, mantendo a

microbiota intestinal normal, inibindo a adesão de bactérias patogênicas à mucosa intestinal, aumentando a imunidade e reduzindo os níveis de colesterol (LIANG et al., 2020; EVIVIE et al., 2019).

Atualmente, a definição de probióticos mais aceita internacionalmente é a adotada pela Organização da Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO) e Organização Mundial de Saúde (WHO). Segundo a FAO/WHO (2002), probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

No que se refere a atividades e benefícios dos probióticos, destacam-se três principais efeitos: nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos. Esses três possíveis mecanismos atuam suprimindo o número de células bacterianas, através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição de nutrientes e competição por sítios de adesão (SAAD, 2006).

Os micro-organismos utilizados como probióticos são usualmente componentes não-patogênicos da microbiota humana, tais como bactérias produtoras de ácido lático: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* e alguns *Streptococcus*; e uma levedura: *Saccharomyces boulardii* (BARBOSA et al., 2006).

O efeito dos probióticos sobre a saúde humana tem gerado grande interesse das indústrias de alimentos, uma vez que representam um forte nicho de mercado entre os alimentos funcionais (BREARTY et al., 2001). Para garantir a funcionalidade e eficácia do alimento probiótico, é necessário que a quantidade de células viáveis gire em torno de 10^6 a 10^8 UFC/g (CHAMPAGNE et al., 2011). Os níveis recomendados de micro-organismos probióticos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), deve ser no mínimo de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), na recomendação diária do produto que as contenha (BRASIL, 2002).

Os dois gêneros mais comumente usados como microrganismos probióticos são *Bifidobacterium* sp. e *Lactobacillus* sp. (HOJJATI et al., 2020).

No Brasil, os micro-organismos permitidos como probióticos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008), sendo que os principais micro-organismos aplicados e estudados são os pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Os *Lactobacillus* pertencem ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL) e são Gram positivos, catalase negativos, anaeróbios facultativos, não esporulam, apresentam-se na forma de bacilos ou cocobacilos e são encontrados em ambientes ricos em carboidratos (VASILJEVIC e SHAH, 2008). Este é o gênero mais numeroso, composto por 106 espécies que se encontram divididos em obrigatoriamente homofermentativos, heterofermentativos obrigatórios e heterofermentativos facultativos (GOMES e MALCATA, 1999; VÁSQUES et al., 2005; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* de forma geral são bastonetes podendo apresentar uma bifurcação em sua extremidade, Gram positivas, anaeróbias, catalase negativas, não esporulam, não apresentam motilidade e, apresentam uma via metabólica especial, permitindo-lhes produzir ácido acético, além de ácido láctico na proporção molar 5 de 3:2 (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Devido a seus efeitos benéficos, outros micro-organismos vem sendo estudados, entre eles alguns do gênero *Bacillus*, *Clostridium* e *Propionibacterium*, assim como algumas leveduras (FOLIGNÉ et al., 2013).

Dentre os micro-organismos que resistem a temperaturas superiores a 35 °C, encontra-se o *Lactobacillus helveticus*, pois apresenta bom crescimento entre 40 a 45 °C, entretanto, podem crescer até 50 – 52 °C, não se desenvolvendo em temperaturas inferiores a 15 °C. Geralmente resistem a temperaturas de 60 °C por 90 min (FURTADO, 1990). Sendo que esta condição de temperatura possibilita a aplicação em diferentes produtos onde tem-se o calor empregado no processo de fabricação, como é o caso do chocolate.

O consumo de alimentos probióticos é impulsionado por efeitos à saúde e promoção de bem estar ao invés de tratamento de sintomas relacionados a doenças (FOLIGNÉ et al., 2013).

A indústria de laticínios domina o mercado probiótico e tem acrescentado culturas probióticas para conferir propriedades funcionais aos seus produtos. *Lactobacillus* e *Bifidobactérias*, pertencentes ao grupo de bactérias benéficas, estão sendo utilizados como probióticos para a recuperação e também para a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal (FERREIRA, 2012).

3.4 Microencapsulação

A microencapsulação consiste em um processo mecânico ou físico-químico que imobiliza e protege os micro-organismos em um material encapsulante, gerando partículas com um diâmetro que variam entre 1 e 1000 µm, sendo dissolvidas e liberando o material

encapsulado no sítio de ação adequado para exercer a função desejada (BORGOGNA et al., 2010). De modo semelhante, a microcápsula consiste em uma camada de um agente encapsulante, geralmente um material polimérico que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa (RÉ, 2000).

Os primeiros registros de tentativas de aplicação da técnica de microencapsulação foram conduzidas na década de 30, mas somente em 1954 surgiu o primeiro produto micro encapsulado. A empresa norte americana National Cash Register Co. foi a pioneira ao comercializar um papel de cópia sem a utilização de um carbono, revolucionando a indústria de formulários (SUAVE et al., 2009).

Na área de alimentos, os estudos sobre microencapsulação tiveram início em 1960 pelo Instituto de Pesquisa Southwest, nos Estados Unidos, com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e a perda de substâncias voláteis e controlar a liberação do aroma (RÉ, 2000).

Existem diversas razões para encapsular ingredientes, para proteger o ingrediente em si, melhorar o produto acabado como um todo ou ainda facilitar o processo de produção.

Um dos grandes desafios das indústrias de alimentos é manter a estabilidade de compostos como vitaminas, antioxidantes, corantes naturais, conservantes, probióticos entre outros. Pesquisas têm demonstrado que as culturas probióticas podem ser significativamente protegidas através da técnica de microencapsulação. Na área de alimentos tem sido uma alternativa empregada para resolver os problemas de instabilidade e inviabilidade de probióticos (KAILASAPATHY, 2009).

3.4.1 Encapsulação de probióticos

A encapsulação de micro-organismos probióticos vem sendo utilizada para aumentar a sobrevivência das bactérias no alimento e durante a passagem pelo trato digestivo. No entanto, é muito importante que as características sensoriais do produto não sejam alteradas (MORENO e KUNIGK, 2014).

Diferentes técnicas podem ser empregadas na microencapsulação de probióticos e cada uma delas resulta em microcápsulas com diferentes características. A viabilidade bacteriana no produto depende da sobrevivência do probiótico aos processos de microencapsulação, do tipo e da concentração do material de revestimento, do tamanho das partículas, do número de células bacterianas inicial e da cepa bacteriana (CHEN; CHEN, 2007).

Em relação à estrutura das cápsulas, o material externo é chamado de agente encapsulante, de cobertura ou parede, enquanto o material encapsulado (probióticos) é chamado de recheio ou núcleo (GIBBS et al., 1999; CHAMPAGNE e FUSTIER, 2007; FÁVARO-TRINDADE et al., 2008; FRITZEN-FREIRE et al., 2013). Ainda, as cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em macrocápsulas, que são aquelas maiores que 5000 µm e, microcápsulas, onde o tamanho varia entre 0,2 e 5000 µm. Os fatores determinantes para o tamanho das cápsulas são basicamente o material de parede e a técnica utilizada para a encapsulação (CAVALHEIRO et al., 2015).

Segundo Fávaro-Trindade et al. (2011) apesar da existência de diferentes técnicas de encapsulação, nem todas podem ser aplicadas para micro-organismos probióticos, pois alguns métodos podem utilizar solventes tóxicos ao micro-organismo ou uso de agentes encapsulantes não reconhecidos como seguros. Entre as técnicas as mais comumente utilizadas são extrusão, atomização (*spray drying*) e emulsificação (CAVALHEIRO et al., 2015).

Segundo Silva (2016) no mercado mundial destacam-se os produtos lácteos representados pelos sorvetes, iogurte, queijo e margarinas. Entretanto, outros produtos conquistaram espaço no mercado como é o caso dos sucos de frutas, barras de cereais, creme de avelã e chocolates. No Brasil apesar da diversidade de frutas, o segmento de alimentos probióticos se restringe aos produtos lácteos, como leite fermentado, iogurte e queijo, devido a conveniência desses processamentos para adição dos probióticos.

Na Tabela 2, pode-se visualizar as pesquisas mais recentes sobre aplicação de probióticos.

Tabela 2. Aplicações de probióticos em alimentos e bebidas.

Alimento ou bebida	Cepa utilizada	Referência
Suco de laranja	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>Paracasei</i> (<i>L. casei</i> – 01) na forma livre.	Costa et al. (2017)
Suco de caju e maçã fermentado	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442 na forma encapsulada.	Pereira, Maciel e Rodrigues (2011)
Sorvete de butiá	<i>Bifidobacterium lactis</i> (B1- 04) na forma livre.	Cruxen et al. (2017)
Sorbet de juçara (<i>E Edulis</i>)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3 e <i>Lactobacillus paracasei</i> BGP-1 na forma livre.	Marinho (2016)
Suco de laranja fermentado em pó	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL na forma encapsulada.	Alves et al. (2016)
Creme de amendoim	5 espécies de <i>Bifidobarcterium</i> e 9 espécies de <i>Lactobacillus</i> na forma livre.	Klu e Chen (2015)

Barra de cereal salgada	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3, <i>Bifidobarcterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BL- C1 encapsulados.	Bampi et al. (2016)
Chocolate ao leite e amargo	<i>L. acidophilus</i> NCFM <i>B. lactilis</i> HN019 na forma livre.	Lalicic-Petronijevic et al. (2015)
Bebidas fermentadas probióticas smoothie	Cultura de probiótico misto, Bifi Kit, CSL, Itália (<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. infantis</i> e <i>B. breve</i>) e uma cultura termofica, X3 Jointec, CSL, Itália (<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . Sub sp <i>bulgaricus</i>) na forma livre.	Gallina et al. (2019)

A Tabela 2 mostra o desenvolvimento de estudos usando probióticos e principalmente usando técnicas de encapsulamento para prolongar a estabilidade destes nos alimentos. Dentre as pesquisas realizadas nos últimos anos, com encapsulamento de probióticos tem-se o desenvolvimento de barra de cereal salgada com *L. acidophilus* LA3, *Bifidobarcterium animalis* subsp. *lactis* BL- C1 empregando o método de *spray chilling* com matriz de óleo de algodão (Bampi et al., 2016). As condições empregadas neste processo foram: homogeneização de 7000 rpm por 60 s, temperatura de aquecimento da matriz lipídica 53 °C e atomização a 5 bar; temperatura da câmara 15 °C ± 2 °C.

Na pesquisa realizada por Alves et al. (2016), com suco de laranja fermentado em pó contendo *Lactobacillus casei* NRRL B-442 encapsulado em matriz de maltodextrina (50%) e goma arábica (50%), seguida da secagem em *spray dryer*. Sendo que as condições de temperatura de entrada do equipamento foi de 140°C e a temperatura de saída de 60 °C, com uma vazão de 0,2 L/h.

No estudo realizado por Pereira, Maciel e Rodrigues (2011), com suco de caju e maçã fermentado em pó, também encapsulados pela técnica de *spray dryer*, usaram como agentes encapsulantes maltodextrina (60%) e goma arábica (40%). A temperatura de entrada do ar de secagem foi 120 °C, com vazão de alimentação de 0,3 L/h.

3.4.2 Agentes encapsulantes

A seleção do agente carreador, conhecido como material de parede ou encapsulante, depende da substância a ser encapsulada e das características desejadas do produto final, como é o caso da liberação controlada de probióticos, onde o material não pode se romper apenas no contato com a água (ARSLAN et al., 2015).

A etapa mais importante que afeta o sucesso do encapsulamento é a seleção de um suporte/material de parede apropriado. O suporte/material de parede deve ser GRAS, biodegradável, barato e ter a capacidade de criar uma barreira entre o material do núcleo e o ambiente externo (LEYLAK et al., 2020).

A escolha do agente encapsulante é de grande importância, pois influencia diretamente na eficiência de encapsulação e estabilidade da micropartícula e possuir as seguintes características: não reagir com o material a ser encapsulado, fácil manuseio, ter a capacidade de selar e manter o material ativo dentro da cápsula, fornecendo a máxima proteção contra condições adversas, não apresentar sabor desagradável e viabilidade econômica (GHARSALLAOUI et al., 2007; SILVA et al., 2014).

A natureza do material encapsulante é um dos principais fatores que influenciam a estabilidade dos materiais encapsulados (ROSEMBERG, et al., 1990). Os agentes encapsulantes podem apresentar diferentes origens, desde natural, semi-sintética ou sintéticas, incluindo materiais poliméricos hidrofílicos ou hidrofóbicos ou ainda uma combinação de ambos (JAIN, 2004).

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 *Lactobacilos*; apesar de que as proteínas e compostos lipídicos também vêm ganhando destaque na microencapsulação de probióticos (VANISKI et al., 2017).

Existem diferentes materiais tais como: alginato, celulose, gomas, gelatina, proteínas do leite, soro de leite que é um subproduto da fabricação de queijos e tem um alto valor nutricional em termos de aminoácidos básicos, proteínas, lactose, sal e gordura (LEYLAK et al., 2020).

O uso de carboidratos com alta energia de ativação ajuda a prevenir estresses térmicos e oxidativos durante o armazenamento. Dentre eles, a maltodextrina é amplamente utilizada como material de revestimento devido à sua não toxicidade, baixo custo, boa solubilidade, baixa viscosidade mesmo com alto teor de sólidos e disponibilidade. Além disso, a maltodextrina atua moderadamente como um prebiótico. Sua baixa capacidade de emulsificação é preferida apenas em combinação com outros agentes de transporte, como goma arábica (PREMI e SHARMA, 2017; PAULA et al., 2019).

A goma arábica, também se encontra na lista dos produtos mais usados como agente encapsulante. É constituída principalmente por polissacarídeos de alto peso molecular e seus sais. Quando submetido à hidrólise, produz arabinose, galactose, ramnose e ácido glucurônico. Em níveis de 1 a 10%, a goma arábica atua como formador de filme, estabilizador de umidade

(AREPALLY et al., 2019). Além disso, a goma arábica previne a desidratação completa dos componentes celulares e estabiliza as células bacterianas durante a secagem e armazenamento (LIU et al., 2019; TAHERI et al., 2019).

3.4.3 Principais métodos de encapsulação

De modo geral, a microencapsulação é um processo em que pequenas partículas do material de núcleo, podendo estar nos estados sólido, líquido ou até mesmo gasoso, são incorporadas em um material de parede. Essas partículas de núcleo são incorporadas a um material de parede para obter proteção e adquirir fácil manuseio (EDRIS et al., 2016).

Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para encapsular probióticos, sendo que as mais comumente utilizadas são extrusão, atomização (*spray drying*) e emulsificação (CAVALHEIRO, 2016).

A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, sendo que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (SUAVE et al., 2006). Os principais métodos químicos são os seguintes: *spray drying*, *spray cooling*, pulverização em banho térmico, leito fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização. Em relação aos métodos químicos, tem-se a inclusão molecular e polimerização interfacial. Os métodos físico-químicos compreendem coacervação, ou separação de fases, emulsificação seguida de separação de solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (SANTOS et al., 2000).

Para a escolha do método de encapsulamento de probióticos para aplicação em alimentos dois fatores devem ser considerados, sendo eles: o tamanho da microcápsula e a sobrevivência do micro-organismo (SILVA, 2016). Existem diversas técnicas que têm sido empregadas na elaboração de microcápsulas e a seleção do método mais adequado deve ser realizada com base nas propriedades físicas e químicas do material que será encapsulado e do agente encapsulante, analisando-se a finalidade de aplicação do ingrediente alimentício. Dentre estes métodos, os descritos abaixo são os mais comuns na literatura quando associados aos probióticos, sendo eles: coacervação complexa, emulsificação, *spray dryer*, *spray chilling*, *extrusão* e a gelificação iônica, *spray coating* (VANISKI et al., 2017). Com base nos métodos citados acima para encapsulamento de probióticos, segue detalhamento das técnicas mais utilizadas:

3.4.3.1 *Spray Drying* (Atomização)

O método de encapsulamento por *spray drying* é uma técnica inovadora e econômica para encapsular probióticos (VIVEK et al., 2019). Esta técnica baseia-se na pulverização de uma dispersão sólido em óleo ou de uma emulsão água em óleo numa corrente de ar quente, onde está presente o material de parede levando assim à sua secagem e formação de microcápsulas (MAKADIA & SIEGEL, 2011). Ou seja, as partículas sólidas e secas formam-se após o aprisionamento da solução que contém o princípio ativo na membrana (CHENG et al., 2008).

O tempo de exposição das partículas ao calor é curto (geralmente poucos segundos), e a temperatura do núcleo não ultrapassa os 100°C, o que reduz a ocorrência de alterações indesejáveis em compostos termossensíveis. As cápsulas produzidas por atomização são geralmente do tipo matricial, com o núcleo distribuído na forma de micropartículas na matriz seca do material encapsulante. Os mecanismos de liberação do núcleo geralmente associados à atomização são pela ação de solventes e por difusão (AZEREDO, 2005).

A principal vantagem da encapsulação por atomização é a possibilidade de trabalhar com materiais termolábeis, embora alguns compostos de aroma possam ser perdidos. Outra vantagem é o pequeno tamanho das partículas, o que torna o produto altamente solúvel (AZEREDO, 2005).

Hadzieva et al. (2017), utilizaram essa técnica para encapsular *Lactobacillus casei*, usando como agentes encapsulante proteína de soja e alginato. Essa mesma técnica foi usada por Nunes et al. (2018), que encapsulou *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 usando como agentes encapsulantes goma arábica e maltodextrina.

A secagem por pulverização é o método mais potencial, principalmente para modificar as condições durante a secagem e para controlar o tamanho e a forma da partícula. A microencapsulação é um método promissor para proteger as células probióticas contra as condições adversas que podem enfrentar (SILVA et al., 2020; ETCHEPARE et al., 2020). Entre as muitas técnicas de microencapsulação, a secagem por spray é uma das mais interessantes devido ao seu baixo custo, potencial de grande escala, alta estabilidade probiótica e baixa quantidade de degradação durante a secagem se o processo de secagem e os parâmetros da formulação foram otimizados corretamente (AREPALLY et al., 2020; HADZIEVA et al., 2017) Os parâmetros do processo de secagem, como temperatura de saída, taxa de alimentação, temperatura de entrada, tempo de secagem e meio de secagem podem ser controlados o que contribui para a sobrevivência do probiótico.

3.4.3.2 *Spray cooling*

Essa técnica também é conhecida por *spray chilling*. Fundamenta-se na injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula (CHAMPAGNE e FUSTIER 2007). É o processo de atomização de um material fundido em uma câmara refrigerada que resultará na formação de um pó (micropartículas) que são sólidas a temperatura ambiente (SILLICK e GREGSON, 2012). Essa técnica, vem ganhando destaque por apresentar inúmeras vantagens, como rapidez, bom desempenho e custo de processo relativamente baixo, além de dispensar o uso de água ou de solventes orgânicos para sua execução (OKURO et al., 2013).

Também conhecido como resfriamento por spray e congelamento por spray, este processo é análogo à secagem por spray, especialmente devido à produção de pequenas gotas. No entanto, nesta técnica, o agente encapsulado é disperso em um fundido matriz, formada por lipídios, que é atomizada em uma câmara onde o ar frio é injetado, possibilitando a solidificação das partículas. Embora este método não seja novo, o resfriamento por pulverização é menos explorado do que a secagem por pulverização e gelificação iônica. No entanto, suas condições de processo representam uma excelente alternativa para encapsular células microbianas, principalmente devido ao baixo custo e escala industrial (RODRIGUES et al., 2020).

Silva (2016) usou essa técnica para encapsular *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifido bacterium animalis subsp. lactis* utilizando gordura vegetal como agente encapsulante. Okuro et al. (2013) co-encapsularam pelo mesmo método *Lactobacillus acidophilus* ou *Lactobacillus rhamnosus* com inulina ou polidextrose utilizando gordura como agente encapsulante. Bampi et al. (2016) também usou essa técnica para encapsular *Lactobacillus acidophilus* LA3, *Bifidobarcterium animalis subsp. lactis* BL- C1 utilizando óleo de algodão como agente encapsulante.

3.4.3.3 *Spray coating*

Essa técnica tem como base a dispersão do princípio ativo numa corrente de ar e o revestimento por aspensão das partículas suspensas na corrente (KUMAR et al., 2017). Os princípios ativos sólidos são colocados inicialmente numa câmara de revestimento de forma a ficarem suspensos na corrente de ar. Na sequência, passam por um orifício onde são pulverizados pelo material de revestimento. Após a evaporação do solvente, as partículas revestidas voltam ao local inicial. O ciclo é repetido até as microcápsulas apresentarem a espessura desejada (CHENG et al., 2008).

É uma técnica que possibilita um maior controle e maior flexibilidade, pois permite controlar a espessura das microcápsulas e é bastante flexível no que se refere a variedade de materiais usados como revestimento (BANSODE et al., 2010).

3.4.3.4 Extrusão

Nessa técnica, o princípio ativo é bombeado para um tubo central enquanto o material de parede é bombeado para dois tubos que se dispõem lado a lado do tubo central. No final de ambos os tubos, encontra-se o orifício concêntrico e é neste local que se dá a formação das microcápsulas. As microcápsulas produzidas podem apresentar um diâmetro entre 400 e 2000 μm (CHENG et al., 2008).

A extrusão é desenvolvida na tecnologia de vibração e, em particular, quando o comprimento de onda de uma perturbação assimétrica excede a circunferência do jato, a separação ocorre. O tamanho da gota depende do diâmetro do bico (jato), viscosidade do fluido, tensão superficial, velocidade do jato e frequência de perturbação (OLIVARES e SILVA, 2019).

A extrusão é um método simples e barato e como não envolve o uso de condições extremas, produz uma grande viabilidade probiótica. Geralmente, a eficiência de encapsulação (EE) ao utilizar essa técnica é próxima de 100% (KRASAEKOOPT et al., 2003; BURGAIN et al., 2011). Uma desvantagem que este método possui é que só é possível encapsular líquidos (CHENG et al., 2008).

3.4.3.5 Emulsão

Esta técnica consiste na dispersão da solução contendo os microrganismos e o material encapsulante (fase dispersa) em um óleo (fase contínua). Esta mistura quando submetida à agitação forma uma emulsão água em óleo (W/O), que pode ser tanto permanente quanto temporária (KRASAEKOOPT et al., 2003).

As principais vantagens desta técnica são a facilidade de utilizá-la em grande escala e a obtenção de uma alta eficiência de encapsulação (CHEN e CHEN, 2007). Ainda, a técnica de emulsão é capaz de formar cápsulas com tamanho muito menor quando comparada à técnica de extrusão, o que pode ser considerado como uma característica desejável dependendo do tipo de alimento onde elas serão incorporadas (BURGAIN et al., 2011).

3.4.3.6 Coacervação complexa

A formação dos complexos de biopolímeros deve-se principalmente às interações eletrostáticas que dependem do grau de ionização dos polímeros. A coacervação depende da carga líquida do sistema, sendo conseqüentemente influenciada pela estequiometria, por parâmetros estruturais dos biopolímeros e pelas condições do meio como pH, força iônica, temperatura e natureza dos reagentes (VANISKI, CORTI e DRUNKLER, 2017).

3.4.3.7 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 (BUREY et al., 2008).

3.5 Considerações finais ao estudo da arte

A microencapsulação vem sendo avaliada na obtenção de alimentos probióticos como uma forma de proteção das células viáveis, bem como na manutenção da viabilidade da bactéria durante a vida útil do produto.

Na literatura, alguns estudos demonstram a viabilidade da aplicação de probióticos microencapsulados em iogurtes (RIBEIRO et al., 2014), sorvetes (CHAMPAGNE et al., 2015), fórmulas infantis (KENT e DOHERTY, 2014), produtos cárneos (WANG et al., 2015), indicando que esta técnica pode proteger os probióticos de condições adversas, mantendo maior estabilidade durante o processamento.

O *spray dryer* é uma das técnicas de secagem que se destacam na indústria alimentícia, por ser um processo rápido, contínuo e econômico.

O chocolate por se tratar de uma matriz alimentícia ainda em exploração no mercado de produtos probióticos, porém muito atrativa comercialmente torna-se uma opção interessante para ser estudada e principalmente por não ter sido relatada estudos com o probiótico *Lactobacillus helveticus* encapsulado em chocolate branco. Nos estudos relatados com a adição de probióticos em chocolates, nenhum deles trata-se de chocolate branco e da utilização de matrizes composta por 50% maltodextrina + 50% goma arábica e 30% leite em pó + 19% maltodextrina + 19% trealose + 20% frutoligossacarídeo + 10% amido + 2% tween 0,1%, o que nos traz mais uma oportunidade de desenvolvermos um novo produto.

O futuro da indústria de alimentos está fundamentado na inovação. Aqui, não estamos falando simplesmente em soluções tecnológicas, mas sim, em novas maneiras de agir, formular estratégias e encarar o novo estilo de vida do consumidor, que preza cada vez mais pelo bem-estar e pela manutenção da saúde.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item são apresentados os procedimentos operacionais e as metodologias empregadas no preparo do probiótico e da matriz encapsulante, secagem do probiótico encapsulado, caracterização do material encapsulado, aplicação do probiótico livre e encapsulado no chocolate e caracterização do produto, bem como, a avaliação da resistência do probiótico encapsulados sob diferentes condições de stress (pH, NaCl, sacarose e temperatura).

4.1 Materiais

A cepa *Lactobacillus helveticus* (LH 091) comercial foi adquirida na empresa Sacco Brasil, Campinas. Em relação aos polímeros, a goma arábica foi adquirida da empresa Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil), a maltodextrina e o amido da empresa Ingredion (Mogi Guaçu, Brasil) as amostras de gelatina da Gelnex (Itá, Brasil), a quitosana e a trealose da empresa Purifarma (São Paulo, Brasil), e o leite da marca Elege adquirido em supermercado local, respectivamente. No que se refere as matérias-primas utilizada na fabricação do chocolate, o leite em pó integral e o leite em pó desnatado foram adquiridos da empresa Elege (Teutônia, Brasil), a manteiga de cacau da empresa IBC Cacau (São Paulo, Brasil), o açúcar cristal da empresa Coopersucar (São Paulo, Brasil), a vanilina da empresa Rodhia (São Paulo, Brasil) e os emulsificantes da empresa Olfar (Erechim, Brasil) e Pausgard (São Paulo, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Definição de matriz encapsulante

Inicialmente, realizaram-se vários experimentos (Tratamento 1 a 9) visando definir a matriz encapsulante e a concentração. Os tratamentos e as concentrações foram definidos baseados em ensaios preliminares e informações da literatura (VANISKI, CORTI e DRUNKLER, 2017): Tratamento 1 – Quitosana (100%); Tratamento 2 – Gelatina *bloom* 189 (100%); Tratamento 3 – Gelatina *bloom* 246 (100%); Tratamento 4 – Goma arábica (100%); Tratamento 5 – Maltodextrina (100%); Tratamento 6 – 70% maltodextrina 30% goma arábica; Tratamento 7 – 60% maltodextrina: 40% goma arábica; Tratamento 8 - 50% maltodextrina: 50% goma arábica; Tratamento 9 – 30% leite em pó + 19% maltodextrina + 19% trealose + 20% frutoligossacarídeo + 10% amido + 2% tween 0,1%.

Esses agentes foram testados em uma amostra de chocolate branco comercial, ou seja, realizou-se o derretimento das amostras do chocolate e a retemperagem, onde incorporou-se o agente encapsulante (Tratamento 1 a 9) nas concentrações de 3, 5 e 7%. Após essa etapa, a moldagem do chocolate foi realizada em recipiente de acrílico e, em seguida, resfriadas em geladeira convencional 5 – 7 °C. Para retirada das bolhas de ar dos recipientes foi utilizado um processo manual. O tempo de resfriamento foi em média de 20 min. As amostras foram retiradas da geladeira, desmoldadas e acondicionadas individualmente em embalagens de papel alumínio em sala climatizada a 18 – 20 °C.

As barras de chocolate foram identificadas e armazenadas a 20 °C por sete dias permitindo a formação dos cristais β estáveis (LUCCAS, 2011). Após este período as amostras foram analisadas sensorialmente. Amostras de 10 g foram distribuídas aos provadores não treinados (n = 25), de forma balanceada, em recipientes de plástico codificados com números de três dígitos aos, juntamente com uma ficha de avaliação para o teste de escala hedônica de 9 pontos (1 – desgostei muitíssimo e 9 – gostei muitíssimo), conforme metodologia descrita por Stone e Sidel (1993). Entre uma amostra e outra foi utilizada água mineral à temperatura ambiente e biscoito água e sal para eliminar o gosto residual das amostras.

Antes da realização das análises sensoriais o projeto foi submetido a aprovação pelo comitê de ética sob número de registro 01804818.3.0000.5351. Os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), no qual aceitaram em participar voluntariamente das avaliações sensoriais e autorizarão a divulgação dos resultados da avaliação sensorial.

4.2.2 Preparo do probiótico para encapsulamento

No preparo do probiótico *L. helveticus* realizou-se vários experimentos visando a obtenção de uma suspensão de célula bacteriana viáveis de 10^8 – 10^9 UFC (BRASIL, 2002). A seguir são detalhados os ensaios realizados de preparo do inóculo:

Ensaio 1: No preparo do inóculo seguiu-se metodologia descrita por Silva (2016), com adaptações. A cepa liofilizada (1 g) foi reativada em 10 mL de caldo Luria – Bertani (LB), incubadas em estufa a $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ por 24 h em jarra de anaerobiose, Em seguida, transferiu-se 10 mL do cultivo para 90 mL de caldo LB e incubou-se a $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ por 24 h. Posteriormente, realizou-se um repique empregando 100 mL do pré-inóculo, obtido anteriormente, em 500 mL de caldo LB, incubado a $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ por 24 h em jarra de anaerobiose. Em seguida, a suspensão foi centrifugada (MeD Instrumentos - MPW 351R) a

7000 rpm, 5 min a 5 °C. As células foram lavadas duas vezes com solução de citrato de sódio 2%, sendo ressuspensa em 10 mL de citrato de sódio 2% para obtenção de uma suspensão bacteriana, a qual foi realizada a contagem das células viáveis.

Ensaio 2: Neste ensaio seguiu-se os mesmos procedimentos descritos para o ensaio 1, somente variou-se o tempo de incubação de 48 h na estufa, a 35 °C ± 1 °C em jarra de anaerobiose.

Ensaio 3: Neste ensaio reativou-se a 1 g de cepa com 10 mL de caldo LB, incubadas em estufa a 35 °C ± 1 °C por 48 h em jarra de anaerobiose. Em seguida, transferiu-se 10 mL do cultivo para 100 mL de caldo LB, completando-se 110 mL, o frasco com o cultivo foi incubado a 35 °C ± 1 °C por 48 h. Após este período, o frasco que continha 110 mL do cultivo foi subdividido em duas frações, ou seja, 55 mL do cultivo anterior foi adicionado a 500 mL de caldo LB e 55 mL foram adicionados, também, a 500 mL de caldo LB, resultando em 1,1 L do cultivo, sendo incubado novamente a 35 °C ± 1 °C por 48 h em anaerobiose. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 7000 rpm por 10 min, na temperatura de 5 °C. As células foram lavadas duas vezes com solução de citrato de sódio 2%, sendo resuspenso em 7 mL de citrato de sódio 2% para obtenção de uma suspensão bacteriana.

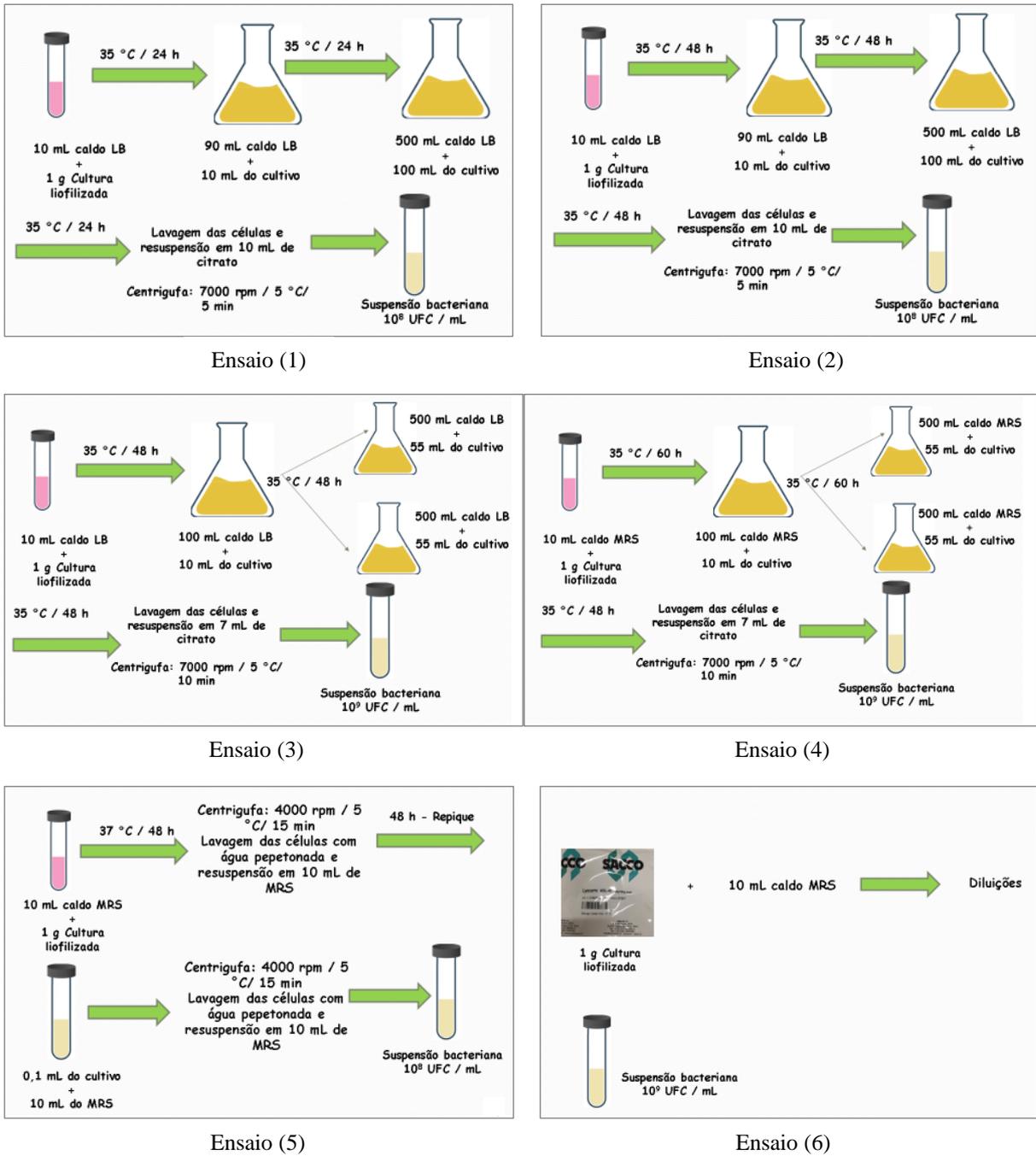
Ensaio 4: Neste ensaio seguiu-se os mesmos procedimentos do ensaio 3 porém reativando-se 1 g de cepa em 10 mL de caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe), e incubando-se em estufa a 35 °C ± 1 °C por 60 h em anaerobiose. Em seguida, transferiu-se 10 mL do cultivo para 100 mL de caldo MRS, completando-se 110 mL, o frasco com o cultivo foi incubado a 35 °C ± 1 °C por 60 h. Para as demais etapas seguiu-se os procedimentos descritos anteriormente.

Ensaio 5: Inicialmente, 1 g da cepa liofilizada foi reativada em 10 mL de caldo MRS incubadas em estufa a 37 °C ± 1 °C por 48 h em jarra de anaerobiose. Em seguida, o material foi centrifugado (MeD Instrumentos - MPW 351R) a 4000 rpm por 15 min na temperatura de 5 °C, lavado com água peptonada, sendo resuspenso em 10 mL de caldo MRS para obtenção de uma suspensão bacteriana. Essa suspensão bacteriana, serviu como base para produção de massa celular, onde a cada 48 h realizava-se o repique de uma alíquota de 0,1 ml e inoculava-se em 10 mL de MRS, centrifugava-se (MeD Instrumentos - MPW 351R) a 4000 rpm por 15 min na temperatura de 5 °C, lavado com água peptonada, sendo resuspendido em 10 mL de caldo MRS para obtenção de massa celular e após realizava-se a contagem das células viáveis da suspensão.

Ensaio 6: A cepa liofilizada (1 g) foi reativada em 10 mL de caldo MRS, e após realizou-se as sucessivas diluições e contagem das células viáveis.

A Figura 2 representa os ensaios realizados para preparo do probiótico para encapsulamento.

Figura 2. Esquema resumido do procedimento realizado nos ensaios para preparo do probiótico para encapsulamento.



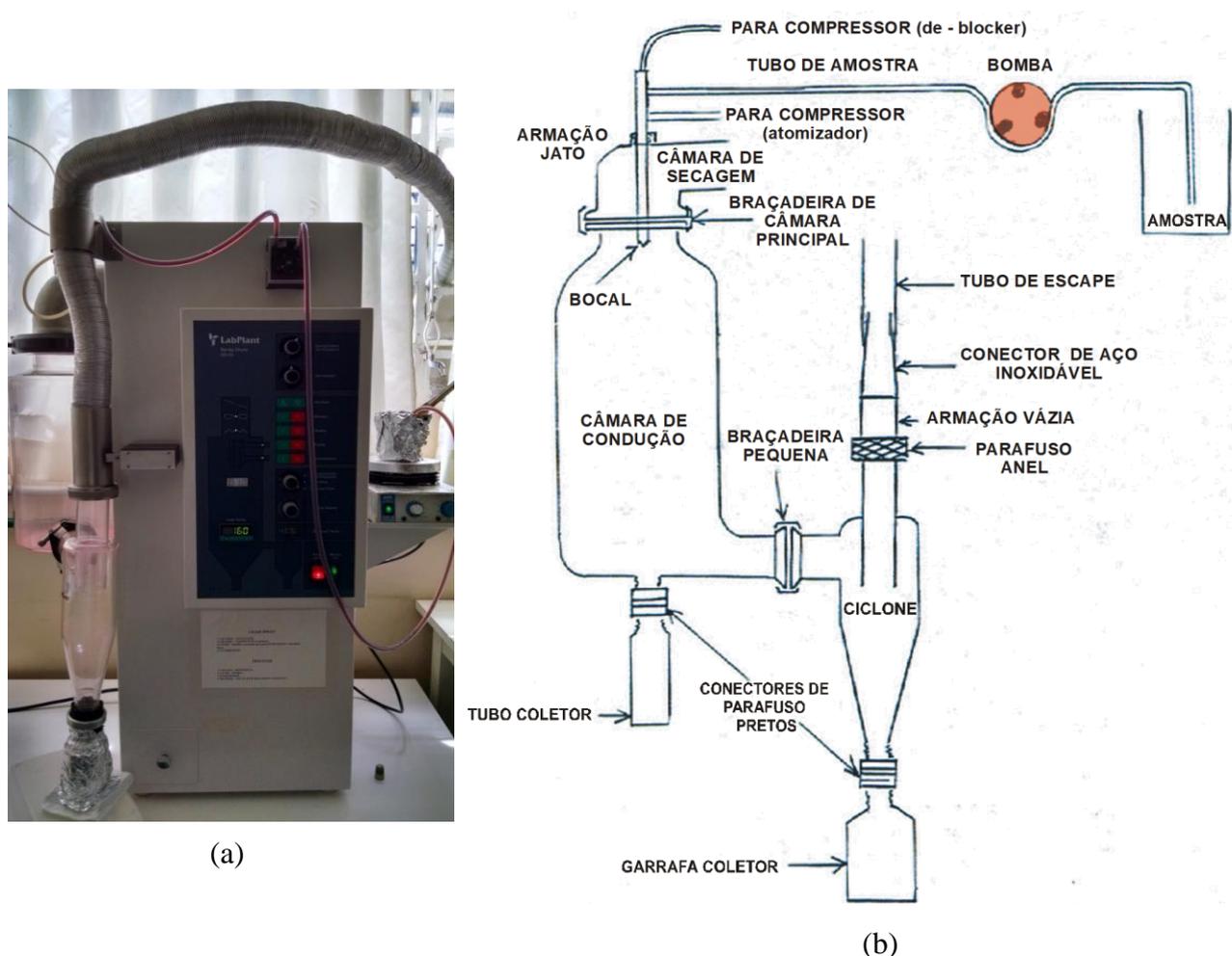
Fonte: A autora.

4.2.3 Encapsulamento por *Spray Dryer*

4.2.3.1 Definição parâmetros de secagem

Para a secagem foi utilizado um secador por atomização, conforme Figura 3.

Figura 3. Aspecto geral do *spray dryer* utilizado da matriz encapsulante e/ou probiótico/matriz encapsulante (a) e representação esquemática dos componentes (b).



Fonte: VALDUGA, et al., 2003.

As condições operacionais da secagem por atomização em *spray dryer* foram definidas com base em testes preliminares e estudos referidos na literatura (VALDUGA et al., 2008; PAULETTO, 2016), conforme descrito na Tabela 3, que mostra os testes realizados para definição da melhor condição para seguir com os experimentos. As condições operacionais 1 a 5 usou-se o agente encapsulante 50% goma arábica e 50% maltodextrina. Nas condições 6,7 e

8 usou-se o agente encapsulante 30% leite em pó, 19% maltodextrina, 19% trealose, 20%, frutoligossacarídeo, 10% amido e 2% tween (0,1%).

Tabela 3. Condições operacionais do *spray dryer*.

Condições operacionais	Temperatura ar de secagem (°C)	Temperatura de saída ar de secagem (°C)
1	70	44
2	80	51
3	90	56
4	100	59
5	110	61
6	120	65
7	130	68

*O diâmetro do orifício do bico injetor pneumático: 0,5 mm; Pressão de atomização: 0,08-0,12 bar; Vazão: 0,09 mL/min.

Fonte: BARRO (2014).

A amostra em solução (material encapsulante/solução tampão fosfato pH 7,0) foi bombeada até o topo do atomizador, onde entrou em contato com o ar aquecido na câmara de secagem, ocorrendo à evaporação imediata da umidade contida no material. A corrente de ar quente-sólido foi direcionada em um ciclone onde se efetuou a separação do extrato encapsulado em recipiente de vidro (coletor de pó). Como resposta avaliou-se a atividade de água, umidade e rendimento.

4.2.3.2 Encapsulamento do probiótico e secagem

Antes do processo de secagem o *spray dryer* (Marca: Lab Plant, modelo: SD05) foi higienizado com água miliq, na temperatura de 150 °C, onde a mesma recirculou por um tempo de 10 min. A agulha do equipamento, também, foi higienizada previamente, mantendo-se em contato com álcool 70% por 30 min.

Inicialmente, realizou-se o encapsulamento do probiótico (Ensaio 1, 2, 3, 4 e 5, item 4.2.2) com uma concentração de 24 g de matriz encapsulante composta por 50% goma arábica e 50% maltodextrina (Tratamento 8, item 4.2.1). A matriz encapsulante foi hidratada com 100 mL de solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) por 2 h com agitação magnética. Após

esse tempo de hidratação foi adicionado 1 g de massa celular do probiótico (10^8 - 10^9 UFC/g), mantendo – os sob agitação por 10 min. Posteriormente, realizou-se a secagem em *spray drier*, onde a mistura (probiótico/matriz encapsulante/solução tampão) foi bombeada a uma vazão de 0,08 mL/min, na pressão de 0,08 a 0,12 bar, na temperatura de entrada de 70 °C (câmara de secagem) e temperatura de saída de 44 °C.

Quando o micro-organismo foi utilizado na forma liofilizada (Ensaio 6, item 4.2.2), realizou-se a secagem usando dois tipos de matriz encapsulante, ou seja, matriz 50% mltodextrina: 50% goma arábica bem como a matriz composta por 30% de leite em pó, 19% maltodextrina, 19% trealose, 20% frutoligossacarídeo, 10% amido, 2% tween (Tratamento 9, item 4.2.1).

Para a matriz 50% maltodextrina: 50% goma arábica, a mesma foi hidratada com 100 mL de solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) por 2 h com agitação magnética. Após esse tempo de hidratação foi adicionado 1 g de massa celular do probiótico (10^8 - 10^9 UFC/g), mantendo – os sob agitação por 10 min. Posteriormente, realizou-se a secagem em *spray drier*, onde a mistura (probiótico/matriz encapsulante/solução tampão) foi bombeada a uma vazão de 0,08 mL/min, na pressão de 0,08 a 0,12 bar, na temperatura de entrada de 70 °C (câmara de secagem) e temperatura de saída de 44 °C.

Empregando a matriz encapsulante composta por 30% de leite em pó, 19% maltodextrina, 19% trealose, 20% frutoligossacarídeo, 10% amido, 2% tween (Tratamento 9, item 4.2.1), 18 g de probiótico liofilizado (Ensaio 6, item 4.2.2) e 24 g de agente encapsulante foram hidratados com 100 mL de solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) por 2 h com agitação magnética. Após esse tempo de hidratação foi adicionado 1 g de massa celular do probiótico (10^8 - 10^9 UFC/g), mantendo – os sob agitação por 10 min. Posteriormente, realizou-se a secagem em *spray drier*, onde a mistura (probiótico/matriz encapsulante/solução tampão) foi bombeada a uma vazão de 0,08 mL/min, na pressão de 0,08 a 0,12 bar, nas temperaturas de entrada de 110 °C, 120 °C e 130 °C (câmara de secagem) e temperatura de saída de 61 °C, 65 °C e 68 °C respectivamente.

Nos ensaios, após a etapa de secagem avaliou-se a contagem de probiótico, a atividade de água, umidade e da condição maximizada avaliou-se características da microcápsula (morfologia).

4.2.4 Formulação de chocolate com adição do probiótico

As matérias primas utilizadas para fabricação de chocolate branco foram as seguintes: leite em pó integral, leite em pó desnatado, manteiga de cacau, açúcar cristal, vanilina e, emulsificantes. As marcas e quantidades não foram declaradas por se tratar de formulação industrial.

A primeira etapa realizada foi a moagem do açúcar até granulometria de 25 μm , em seguida a pesagem dos demais ingredientes da formulação, na sequência a etapa de mistura foi realizada no mesmo equipamento onde realizou-se a etapa de conchagem.

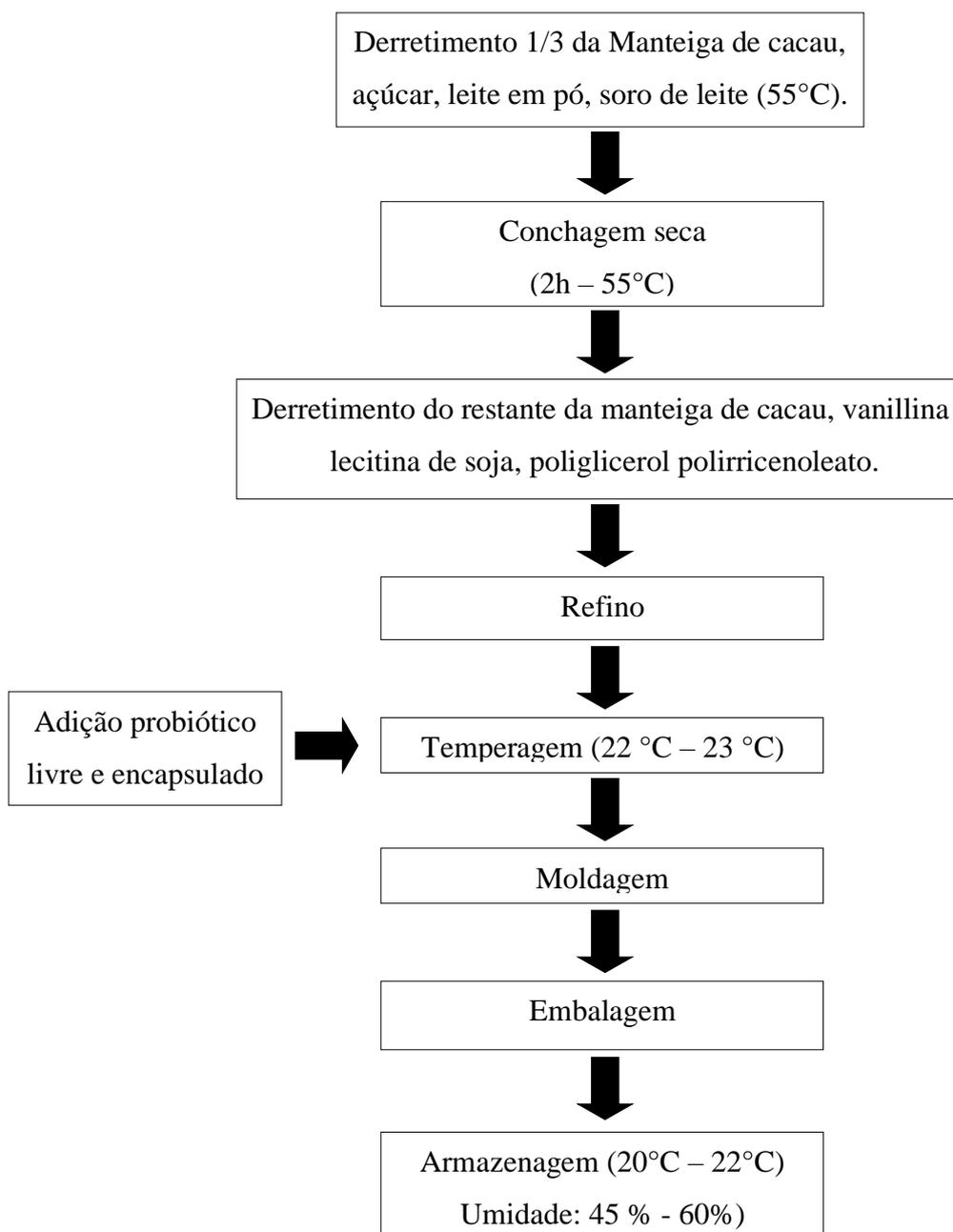
O processo de fabricação foi realizado em Unidade Industrial da região do Alto Uruguai, segundo metodologia descrita por Barro (2014), com modificações. Inicialmente, realizou-se o derretimento de 1/3 da manteiga de cacau a uma temperatura de 55 °C, após a manteiga estar completamente derretida adicionou-se os ingredientes em pó (açúcar, leite em pó integral e desnatado). Neste momento, iniciou-se a etapa de conchagem por 2 h a uma temperatura de 55 °C. Após 2 h adicionou-se o restante da manteiga de cacau, a lecitina de soja e o poliglicerol poliricinoleato. Posteriormente, o produto passou por um moinho de esferas, onde permaneceu entre 30 e 40 min, até que atingir 22 μm , com temperatura controlada de 40 °C a uma rotação de 54 rpm. Após a etapa de moagem realizou-se a etapa de temperagem, onde adicionou-se o probiótico livre e encapsulado, com temperatura em torno de 22-23 °C.

A moldagem do chocolate foi realizada em formas de acrílico e, em seguida, o resfriamento em geladeira convencional, em temperaturas de 5 – 7 °C. Para retirada das bolhas de ar das formas, foi utilizado um processo manual, onde as formas foram vibradas sobre a bancada de mármore até completa eliminação das bolhas de ar. O tempo de resfriamento foi em média 20 min. As amostras foram retiradas da geladeira, desmoldadas e acondicionadas individualmente em embalagens de papel alumínio em sala climatizada a 18 – 20 °C.

As barras de chocolate foram identificadas e armazenadas a 20 °C por sete dias permitindo a formação dos cristais β estáveis. Após este período as amostras foram caracterizadas mediante determinações físico-químicas e contagem do probiótico. Avaliou-se também, a estabilidade do chocolate e do probiótico em amostras de chocolate, em diferentes períodos de armazenamento a 22 °C.

A Figura 4 apresenta-se um fluxograma resumido do processo utilizado.

Figura 4. Processo de fabricação de chocolate.



Fonte: adaptado de BARRO (2014).

4.2.5 Avaliação da resistência do probiótico encapsulado sob diferentes condições de stress ao pH, NaCl, sacarose e temperatura

O efeito do pH foi avaliado seguindo a metodologia proposta por Fávoro-Trindade e Grosso (2002), com algumas modificações. Soluções de citrato de sódio 2 % foram acidificadas com HCl, para os valores de pH 2, 4,5 e 7. Assim, aproximadamente 1 g das micropartículas lipídicas são adicionadas em 9 mL de solução acidificada, e como controle utiliza-se o inóculo.

A resistência do probiótico foi avaliada por enumeração no tempo inicial e após 3 h incubado a 37°C.

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

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

4.2.6 Avaliação da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado em amostras de chocolate branco durante a estocagem a 25 °C

A sobrevivência do probiótico pode ser afetada durante o tempo de armazenamento do produto. Devido a esse fato a enumeração destes durante o tempo de estocagem torna-se essencial. Essa avaliação foi realizada segundo estudo realizado por Silva (2016) com modificações, onde a temperatura de armazenamento será de 22 °C. Amostra de aproximadamente 5 g de chocolate foi coletada em diferentes períodos de armazenamento, sendo que a mesma foi ralada e derretida em banho-maria e após diluída em 45 mL de água pptonada. Após alíquotas de 1 mL foram removidas e diluídas serialmente e inoculadas em ágar MRS. Em seguida as placas inoculadas foram incubadas em estufa a 35 °C \pm 1 °C acondicionadas dentro de uma jarra de anaerobiose por 48 h para posterior enumeração das colônias, que são expressas em UFC/g de chocolate.

As avaliações foram realizadas por um período de aproximadamente 100 dias.

4.2.7 Determinações Analíticas

Nas matrizes encapsulantes, após a secagem por *spray drier* avaliou-se a umidade, atividade de água (A_w), morfologia, tamanho e distribuição de partículas e estabilidade térmica.

Para caracterizar a formulação de chocolate branco e avaliar a estabilidade ao armazenamento foram realizadas as determinações de pH, atividade de água (A_w), umidade, acidez e cor.

4.2.7.1 pH

O pH utilizou-se um potenciômetro de pH DIGIMED DM-20 por leitura direta na amostra diluída, conforme metodologia descrita no Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.2.7.2 Atividade de água (A_w)

A determinação da atividade de água foi realizada pelo analisador de atividade de água – Labtouch, marca Novasina, efetuando-se a calibração do aparelho com água deionizada e solução de NaCl com 0,819 de A_w até sua estabilização, e em seguida feita à leitura da $A_w/T^{\circ}C$ da amostra.

4.2.7.3 Umidade

A umidade do chocolate foi determinada pelo método de dessecação em estufa (marca Quimis, modelo 317B242) com circulação de ar, à temperatura de 105 °C, segundo metodologia descrita por Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

Para as matrizes encapsulantes a umidade foi determinada por secagem sob infravermelho, em equipamento “Unidade de secagem Mettler LTJ” (Mettler, Brasil). Para a realização da análise, uma alíquota da amostra foi aplicada a um suporte previamente tarado (um prato de alumínio). O conjunto suporte mais alíquota da amostra foi colocado na balança, e a massa inicial foi registrada. Em seguida, incidiu-se a radiação sobre a amostra, e a massa final (peso constante) após o processo foi novamente registrada.

4.2.7.4 Acidez

A acidez foi determinada pelo método de titulação utilizando solução de hidróxido de sódio 0,1M conforme metodologia descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.2.7.5 Cor

A determinação da cor foi realizada pelo método de Colorimetria trístimulo em colorímetro da marca MINOLTA modelo CR410, operando no sistema CIE (L^* , a^* , b^*), sendo, sendo que L^* indica a coordenada de luminosidade ($L^*=0$ – preto e $L^*=100$ – branco), a^* e b^* as coordenadas de cores responsáveis pela cromaticidade: ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ é o verde, $+b^*$ é o amarelo e $-b^*$ é o azul).

4.2.8 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos encapsulados foi analisada em um microscópio de varredura eletrônica –MEV (Zeiss, modelo ECO LS25). A superfície após ser revestida com uma fina camada de ouro foram analisadas com uma ampliação de 1, 10 e 100 μm e tensão de 10 kV.

O diâmetro de partícula foi medido pelo Software Size Meter (versão 1.1) usando uma média de 50 partículas observadas nas fotomicrografias dos experimentos.

4.2.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC das microcápsulas foram obtidas utilizando um Shimadzu DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Amostras de aproximadamente 5 mg de pó foram colocados em recipientes selados de alumínio, sob atmosfera inerte de nitrogênio (150 mL / min) e aquecido 30 °C a 300 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C / min. Análise realizada na Universidade Tiradentes (UNIT).

4.2.10 Análise Termogravimétrica (ATG)

As curvas foram obtidas utilizando uma termobalança DTG-60 (Shimadzu, modelo DTG-60, Kyoto, Japão). Aproximadamente 7 mg de amostras foram colocadas em painéis de alumínio e aquecida de temperatura ambiente (± 22 °C) a 300 °C a uma taxa de 10 °C/ min sob atmosfera inerte de nitrogênio (100 mL / min). Análise realizada na Universidade Tiradentes (UNIT).

4.3 Contagem do micro-organismo probiótico

A contagem da bactéria probiótica foi realizada após a etapa de encapsulamento e no chocolate, logo após a elaboração e durante o armazenamento.

A análise foi conduzida com 25 g de chocolate adicionada de 225 mL de água peptonada. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e homogeneizadas em Stomacher (SP Labor - SP190), após foram preparadas diluições até 10^{12} . A análise microbiológica ocorreu conforme metodologia usada por Grosso e Fávoro-Trindade (2004) e Tharmaraj e Shah, (2003).

Para as diluições seriadas do probiótico, baseado no estudo realizado por Silva (2016), com adaptações, foram realizadas 11 diluições, ou seja, partiu-se de uma contagem de 101 a 1011 sendo que foi usado 10 mL da suspensão diluído em citrato de sódio 2 %. Adicionou-se 1 mL do inóculo para 9 mL da solução de citrato de sódio 2 %. Após as diluições foi realizado o processo de plaqueamento por profundidade. Posteriormente, incubou-se em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h, em jarra de anaerobiose.

4.4 Análise estatística

As determinações foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), e comparação das médias pelo teste de Tukey e/ou t-student ($p < 0,05$), utilizando o software STATISTICA versão 5.0 (Statsoft Inc, USA). Para a análise de correlação de Pearson e dos Componentes Principais (ACP) utilizou-se o programa XLSTAT 2020, versão Free.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados relacionados a definição da matriz encapsulante, processo de secagem do micro-organismo probiótico, bem como, avaliação da sobrevivência do probiótico. Para simplificar e facilitar o entendimento dos experimentos realizados vamos codificar as matrizes encapsulantes usadas no presente trabalho, conforme segue: CPM1 refere-se a matriz encapsulante 50% maltodextrina e 50% goma arábica e CPM2 identifica a matriz 30% leite em pó, 19% maltodextrina, 19% trealose, 20%, frutoligossacarídeo, 10% amido e 2% tween (0,1%).

5.1 Microencapsulamento

5.1.1 Matriz encapsulante

A Tabela 4 apresenta os tratamentos realizados com diferentes matrizes encapsulantes nas concentrações 3, 5 e 7% em amostra de chocolate branco comercial e resposta em pontuação média dos provadores para o teste de escala hedônica.

Tabela 4. Tratamentos realizados para escolha da matriz encapsulante para aplicação em chocolate branco.

Matriz encapsulante	Pontuação dos provadores*		
	3%	5%	7%
Tratamento 1 – Quitosana (100%)	7,2 ^{cA}	7,0 ^{cA}	6,5 ^{dB}
Tratamento 2 – Gelatina <i>bloom</i> 189 (100%)	6,5 ^{dA}	6,0 ^{bB}	5,8 ^{eB}
Tratamento 3 – Gelatina <i>bloom</i> 246 (100%)	6,7 ^{dA}	6,2 ^{bcB}	6,0 ^{eB}
Tratamento 4 – Goma arábica (100%)	8,0 ^{bA}	8,0 ^{bA}	6,8 ^{cB}
Tratamento 5 – Maltodextrina (100%)	8,2 ^{abA}	8,0 ^{bB}	7,2 ^{bc}
Tratamento 6 – 70% maltodextrina e 30% goma arábica	8,0 ^{bA}	7,9 ^{bA}	6,5 ^{dB}
Tratamento 7 – 60% maltodextrina e 40% goma arábica	7,6 ^{bcA}	7,5 ^{cA}	7,0 ^{bcB}
Tratamento 8 – 50% maltodextrina e 50% goma arábica	8,6 ^{aA}	8,5 ^{aA}	8,1 ^{aB}
Tratamento 9 – 30% leite em pó, 19% maltodextrina, 19% trealose, 20%, frutoligossacarídeo, 10% amido e 2% tween (0,1%).	8,5 ^{aA}	8,4 ^{aA}	8,0 ^{aB}

*Média seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (*Teste de Tukey*).

A quitosana (Tratamento 1) e as gelatinas (Tratamentos 2 e 3) influenciaram negativamente ($p < 0,05$) na avaliação global do chocolate branco, alguns provadores relataram a presença de arenosidade no produto bem como alteração de cor do produto. A goma arábica (Tratamento 4) e a maltodextrina (Tratamento 5) analisadas separadamente apresentaram comportamento similar sem alteração significativamente ($p > 0,05$) na avaliação global do produto. A matriz encapsulante do Tratamento 9, na concentração de 5% no chocolate apresentou pontuação média similar a do Tratamento 8. De maneira geral, concentrações de 3 e 5% (m/m) de agentes encapsulantes em amostra de chocolate branco ocasionaram as menores alterações na avaliação global da aceitação no produto.

Após este estudo preliminar, selecionou-se a matriz encapsulante CPM1 (Tratamento 8) bem como a matriz CPM2 (Tratamento 9) para realização dos ensaios de secagem em *spray dryer*, a serem utilizadas na concentração de 5% (m/m) na formulação de chocolate branco, pois ambas apresentaram comportamento similar na avaliação sensorial do chocolate afim de avaliar comparativamente os resultados.

5.1.2 Eficiência do encapsulamento

Na Tabela 5 encontram-se os ensaios realizados de preparo do inóculo do probiótico (*L. helveticus*) e a enumeração das células viáveis antes e após a secagem a 70 °C por *spray drying*, bem como a taxa de sobrevivência do probiótico encapsulado na matriz CPM1.

Tabela 5. Taxa de sobrevivência do *L. helveticus* encapsulado na matriz CPM1 após secagem por *spray dryer*.

Ensaio	Contagem celular antes da secagem (log UFC/g)	Contagem celular após secagem (log UFC/g)	Taxa de sobrevivência (%)*
1 – Cepa reativada em LB/incubação 24h	8,30 ± 0,08	7,30 ± 0,08	87,95 ^c ± 0,169
2 – Cepa reativada em LB/incubação 48h	8,00 ± 0,08	6,00 ± 0,12	75,0 ^d ± 0,205
3 – Divisão do cultivo/cepa reativada em LB/incubação 48h	9,40 ± 0,08	8,36 ± 0,05	88,93 ^b ± 0,174
4 – Cepa reativada em MRS/incubação 60h	9,04 ± 0,08	8,08 ± 0,05	89,38 ^b ± 0,069
5 – Cepa reativada em MRS/incubação 48h	8,08 ± 0,04	7,04 ± 0,03	87,12 ^c ± 0,032
6 – Cepa liofilizada reativada em MRS	10,30 ± 0,08	9,30 ± 0,07	90,48 ^a ± 0,049

*Média seguida de letras minúsculas iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey).

O probiótico foi enumerado na fase de inóculo e também após a atomização da dispersão em *spray dryer*. Na fase de inóculo realizou-se adaptações na metodologia de cultivo visando aumentar a massa celular, pois no Ensaio 1 obteve-se 7,3log UFC/g, que está abaixo da legislação (BRASIL, 2002), pois a recomendação diária do produto ser considerado probiótico é de 8 a 9 log UFC/g.

No Ensaio 2, novas modificações foram realizadas em relação ao tempo de incubação e ao volume de cultivo, no entanto, obteve-se uma contagem de 6 log UFC/g (Tabela 5). Com novas adaptações, no Ensaio 3, obteve-se uma contagem de 8,36 log UFC/g. Ainda, visando aumentar a contagem de células viáveis após a secagem, realizou-se uma modificação na metodologia substituindo o caldo LB para MRS. Na sequência, no Ensaio 5, adaptou-se a metodologia em relação ao volume e tempo de incubação, porém obteve-se uma contagem final após a secagem de 7,04 log UFC/g, com taxa de sobrevivência de 87,12%. No entanto, no Ensaio 6 usando a cepa liofilizada, somente reativada em caldo MRS, obteve-se uma contagem de 9,03 log UFC/g.

Os Ensaios 3, 4 e 6 (Tabela 5) estão de acordo com a legislação (BRASIL, 2002) em vigor, que estabelece que para o produto ser considerado probiótico deverá conter uma contagem de 8 a 9 log UFC/g.

Além do mínimo estabelecido de contagem de células viáveis adicionadas, a seleção adequada do agente encapsulante é fundamental para a proteção das células, durante a secagem por *spray drier* e/ou no produto adicionado. No presente estudo obteve-se para o Ensaio 3 uma taxa de sobrevivência de 88,93% e para o Ensaio 6 de 90,48% (Tabela 5), respectivamente. Sendo que estes resultados aproximaram-se dos relatados por Arslan et al. (2015) ao utilizar goma arábica como agente encapsulante para a secagem por atomização de *S. cerevisiae*, obtiveram uma taxa de sobrevivência de 84%. Nunes et al. (2018) obtiveram uma taxa de sobrevivência de 84,68% utilizando goma arábica para secagem em *spray dryer* de *L. acidophilus*. Lian et al. (2002), também, relataram que a goma arábica aumentou a sobrevivência de *Bifidobacterium* após a secagem por atomização. No estudo realizado por Chagas (2018), a goma arábica foi recomendada como agente encapsulante da bactéria *L. plantarum* P2, obtendo-se uma taxa de sobrevivência entre 60,82 e 91,26%.

De acordo com estudos realizados por Fritzen-Freire et al. (2013), os micro-organismos probióticos encontram dificuldades de viabilidade perante as condições de temperatura e pressão osmótica durante o processo de secagem por atomização. Quando a secagem por *spray* é utilizada, normalmente, uma grande parte da atividade probiótica é perdida depois de algumas semanas de armazenamento à temperatura ambiente. Estas informações puderam ser

confirmadas após o armazenamento do chocolate na temperatura de 25 °C por 100 dias.

Baseado nos resultados obtidos desta etapa e nas discussões realizadas, para os experimentos subsequentes de encapsulamento nas matrizes (CPM1 e CPM2), secagem em *spray drier* e aplicação no chocolate branco, selecionou-se o preparo do inóculo referentes aos Ensaio 3 e 6.

A Tabela 6 apresenta os ensaios com diferentes temperaturas de secagem *spray drying* e a taxa de sobrevivência do probiótico encapsulado em matriz CPM1 e CPM2.

Tabela 6. Temperaturas de secagem em *spray drier* e taxas de sobrevivência do probiótico encapsulado em matriz M1 e M2.

T entrada ar(°C)	T saída ar (°C)	Contagem celular antes da secagem (log UFC/g)	Contagem celular após secagem (log UFC/g)	Taxa de sobrevivência (%)*
Matriz CPM1				
70	44	9,40 ± 0,080	8,36 ± 0,050	88,93 ^a ± 0,174
80	51	9,00 ± 0,080	6,00 ± 0,120	66,70 ^b ± 0,205
90	56	9,04 ± 0,080	4,00 ± 0,100	44,20 ^c ± 0,210
100	59	9,30 ± 0,080	3,00 ± 0,100	32,30 ^d ± 0,190
110	61	9,20 ± 0,080	0	0
Matriz CPM2				
110	61	9,70 ± 0,080	9,67 ± 0,070	99,69 ^a ± 0,870
120	65	9,70 ± 0,080	9,26 ± 0,030	96,49 ^b ± 0,400
130	69	9,70 ± 0,080	9,29 ± 0,027	95,26 ^b ± 0,280

*Média seguida de letras minúsculas iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey).

Para a microcápsula CPM2 foram observadas as maiores taxas de sobrevivência *L. helveticus* de 95,26 a 99,69%. Nas temperaturas de 120 e 130 °C houve diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de sobrevivência quando comparada a temperatura 110 °C, porém a queda na taxa de sobrevivência do probiótico foi 3,51 e 4,74%, demonstrando que a matriz composta por 30% leite em pó, 19% maltodextrina, 19% trealose, 20%, frutoligossacarídeo, 10% amido e 2% tween (0,1%) protege o probiótico do processo térmico por *spray drier*. A goma arábica presente na matriz CPM1 é um polissacarídeo considerado um bom formador de filme mas nesse estudo podemos observar que a combinação da matriz CPM2 apresentou melhor proteção. A presença de leite em pó associada a outros polissacarídeos formaram um filme com maior resistência ao processo de encapsulamento. O alginato ainda é amplamente utilizado para produzir probióticos em pó, no entanto, tem havido um interesse crescente em sua total ou parcial substituição por

outros polissacarídeos, como gomas, mucilagens, prebióticos compostos e exopolissacarídeos microbianos, que melhoram a proteção e sobrevivência das células encapsuladas (RODRIGUES et al., 2020).

As maiores taxas de sobrevivência *L. helveticus* na microcápsula CPM1 foram observadas para as temperaturas de 70 e 80 °C, de 88,93 e 66,7%, respectivamente. No entanto, as microcápsulas que foram secas a temperaturas acima de 80 °C não fornecem o mínimo necessário de células probióticas viáveis para exercer efeitos na saúde (10^7 UFC/g) (ETCHEPARE et al., 2020). A secagem em excesso diminui a viabilidade e estabilidade do probiótico, fato que também foi verificado por LI et al. (2011). Na temperatura de 90 °C observou-se uma queda considerável na taxa de sobrevivência do probiótico que cai de 66,7% para 44,2% e quando se aumentou a temperatura para 100 °C essa taxa cai para 32,3% e a 110 °C ocorreu a morte celular por completo.

A viabilidade dos probióticos microencapsulados após exposição a um processo térmico depende de muitos fatores cruciais, por exemplo, o uso de uma técnica de encapsulamento adequada e a seleção de polímeros adequados (VEMMER; PATEL, 2013).

Segundo resultados obtidos por Arepally e Goswami (2019), que estudaram o efeito da temperatura do ar de entrada e da concentração de goma arábica sobre encapsulamento de probióticos (*Lactobacillus Acidophilus* (NCDC 016)) por secagem em *spray dryer*, obtiveram contagem inicial de bactérias viáveis para todos os tratamentos na faixa de 10,81 a 11,36 log UFC/g na temperatura inicial de 130 °C, observaram que a viabilidade das cepas diminuiu gradualmente de 9,97 para 7,3 log UFC/g ao aumentar a temperatura de entrada. Esta diminuição da viabilidade pode ser devida a lesões celulares como desnaturação do DNA e RNA, desidratação das membranas citoplasmáticas, ruptura e colapso da membrana celular devido à remoção de água (BEHBOUDI-JOBBEHDAR et al., 2013). A principal desvantagem do método de secagem por *spray* para microencapsulação probiótica é a sobrevivência limitada dos probióticos devido ao estresse mecânico e ao tratamento térmico envolvidos (BEHBOUDI-JOBBEHDAR et al., 2013). No estudo realizado por Nunes et al. (2018) a viabilidade das micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 (ML) e *Bifidobacterium* Bb-12 (MB) produzidos em diferentes temperaturas de secagem, variação de 110 °C a 140 °C, também são afetadas pelo aumento da temperatura. Resultados semelhantes foram relatados por Bustamante et al. (2017) com mucilagem extraída da semente de chia às duas diferentes temperaturas do secador por pulverização (110 °C e 140 °C). Arslan et al. (2015) relataram que um aumento na temperatura de entrada de ar do secador por pulverização resultou na diminuição da viabilidade e menores taxas de sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldardi. Fávaro-Trindade

e Grosso (2002) e Lian et al. (2002) relataram que diferentes cepas de microrganismos podem variar em sua capacidade de tolerar as altas temperaturas impostas durante a secagem por pulverização.

5.1.3 Caracterização das microcápsulas

As micropartículas CPM1, bem como as microcápsulas CPM2 produzidas pela técnica de *spray drying* foram caracterizadas em relação a sua atividade água, umidade e morfologia. Para a matriz CPM1 também foram realizadas análises de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimétrica (ATG).

5.1.3.1 Atividade Água (Aw) e Umidade

A Tabela 7 apresenta os valores de atividade água e umidade referentes aos Ensaios 3 e 6, os quais apresentaram maior sobrevivência após processo de secagem das micropartículas M1.

Tabela 7. Condições de secagem em *spray drier* e resposta em atividade de água (Aw) e umidade (%) das microcápsulas com probiótico (Ensaios 3 e 6).

Ensaios	T entrada ar (°C)	T saída ar (°C)	Umidade (%)*	Aw*
Matriz CPM1				
3	70	44	14,50 ^a ± 0,10	0,492 ^a ± 0,0020
6	70	44	14,30 ^a ± 0,10	0,496 ^a ± 0,0017
3	80	51	12,70 ^b ± 0,78	0,436 ^d ± 0,0006
6	80	51	12,50 ^b ± 0,89	0,426 ^e ± 0,0225
3	90	56	10,63 ^c ± 0,06	0,445 ^c ± 0,0006
6	90	56	10,60 ^c ± 0,17	0,462 ^b ± 0,0239
3	100	59	10,67 ^c ± 0,06	0,422 ^e ± 0,0010
6	100	59	10,57 ^c ± 0,06	0,427 ^e ± 0,0025
3	110	61	9,40 ^d ± 0,10	0,402 ^f ± 0,0060
6	110	61	9,33 ^d ± 0,15	0,405 ^f ± 0,0002
Matriz CPM2				
6	110	61	7,70 ^a ± 0,70	0,393 ^a ± 0,0001
6	120	65	5,33 ^b ± 0,23	0,324 ^b ± 0,0058
6	130	68	2,95 ^c ± 0,25	0,195 ^c ± 0,0010

¹Condição operacionais de secagem em *spray drier*: vazão - 0,09 mL/min e pressão de atomização - 0,08 - 0,12bar.
*Média ± desvio padrão seguida de letras diferentes nas colunas indicam haver diferença significativa entre os dados (Teste de Tukey, p < 0,05).

A atividade água e a umidade das micropartículas são parâmetros críticos importantes que influenciam a estabilidade das bactérias probióticas (WANG, YU e CHOU, 2004; SANTIVARANGKNA et al., 2007; KAILASAPATHY, 2009; CASTRO, TEIXEIRA e KIRBY, 1995) e também, podem influenciar na viabilidade probiótica durante o armazenamento que é um dos parâmetros de qualidade a serem considerados nos pós (GUERIN et al., 2017).

As micropartículas (CPM1 e CPM2) apresentaram atividade água inferiores a 0,60 (Tabela 7), o que de acordo com Fávaro-Trindade et al. (2011) e Kearney et al. (2009) é positivo para a estabilidade dos micro-organismos encapsulados, visto que há menos água disponível para reações bioquímicas, prolongando a viabilidade dos mesmos. Referente a umidade observa-se que as amostras secadas com a matriz CPM1 apresentam valores superiores a 10% o que está relacionado com a temperatura empregada no processo de secagem, pois quanto menor a umidade maior é a temperatura empregada o que pode ser visualizado quando empregamos temperaturas maiores usando a matriz CPM2, onde os valores de umidade para a temperatura de 130 °C é de 2,95%.

Nos ensaios 3 e 6 para a matriz CPM1 com temperatura de secagem de 70 °C (Tabela 7) apresentaram umidade de aproximadamente 14,0%, atividade de água de 0,494 e taxa de sobrevivência de 88,93 e 96,48%, respectivamente. Embora, a umidade recomendada para conservação das microcápsulas seja menor de 10 % (GUERIN et al., 2017). No presente estudo, correspondendo aos Ensaios 3 e 6, somente na temperatura de secagem de 110 °C (Tabela 7) obteve-se valores próximo ao recomendado, porém nestas condições de secagem não houve sobrevivência do probiótico (Tabela 5).

Segundo Silva (2016) a estabilidade do probiótico é bastante influenciada pelas características de sorção de umidade do produto.

Em relação a atividade de água para ambas as matrizes observa-se que há diminuição com o aumento da temperatura do ar de entrada. Tendência semelhante foi observada por Medeiros et al. (2014), que relataram a atividade da água no iogurte de cabra seco pó com probióticos adicionados como 0,19, 0,18 e 0,15 com diferentes temperaturas do ar de entrada, 130, 150 e 170 °C, respectivamente. Ao aumentar o nível de concentração de goma arábica de 0% a 2,5 e 5%, com temperatura de secagem de 130 °C, a atividade da água diminuiu de 0,52 para 0,49 e 0,44, respectivamente. Essa diminuição da atividade da água pode ser devida à afinidade da goma arábica pela água, proporcionando um ambiente extremamente favorável para água de ligação, provavelmente devido principalmente ao carboidrato componente da goma arábica e devido às suas características altamente ramificadas (SANCHEZ et al., 2018).

Entretanto, a secagem em excesso pode diminuir a viabilidade e estabilidade dos micro-organismos (LI et al., 2011). Semyonov et al. (2010) observaram valores de A_w de 0,33 a 0,8 para microcápsulas de *L. paracasei*. Estes resultados corroboram com encontrados nas microcápsulas produzidas neste estudo.

No estudo realizado por Nunes et al. (2018), os resultados de A_w encontrada para o *L. acidophilus* La-5e foi de 0,289 para *MB Bifidobacterium* Bb-12 foi de 0,228, com secagem em *spray drier* a 110 °C.

Chávez e Ledebøer (2007) verificaram que as microcápsulas obtidas pelo processo de secagem por *spray drying* e elaboradas com isolado proteico de soja e maltodextrina apresentaram atividade de água de 0,35. Enquanto, Fávaro Trindade et al. (2011) observaram valores entre 0,25 e 0,27 para partículas produzidas a partir de isolado proteico de soja e gelatina.

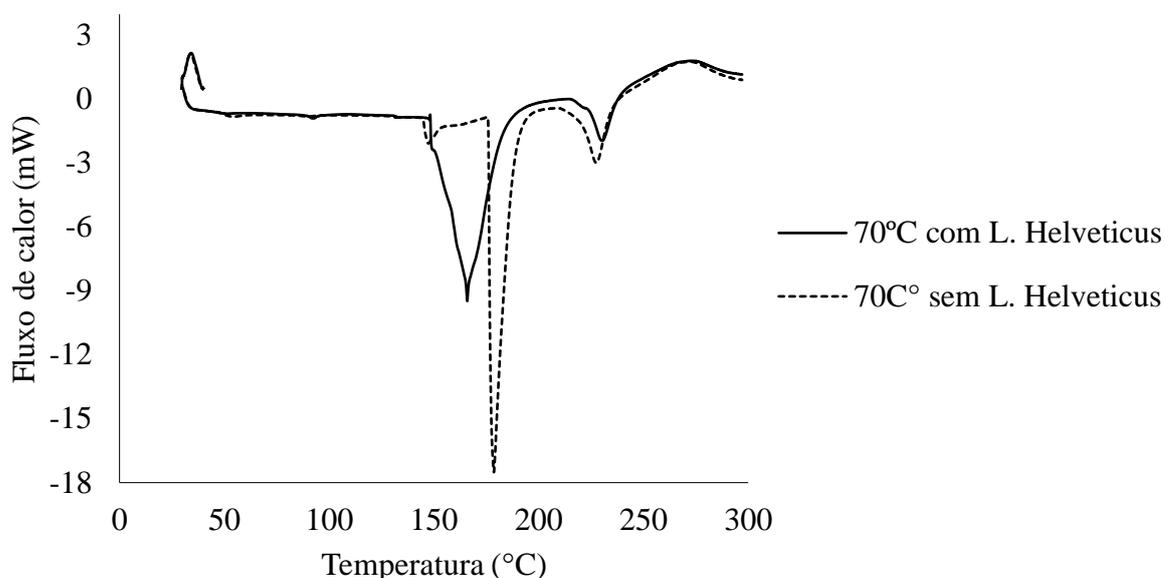
No estudo realizado por Goswami e Arepally (2019) observou que o pó seco por *spray drier* teve o maior valor de atividade de água (0,52) na concentração de goma arábica de 0% e na temperatura do ar de entrada de 130 °C e o menor valor de atividade de água de 0,33 na concentração de 10% de goma arábica e em temperatura do ar de entrada de 150 °C. Em geral, pós com atividade de água de 0,6 ou menos é geralmente considerado seguro em relação aos aspectos microbiológicos e bioquímicos (KUMAR et al., 2017).

De acordo com estudos realizados por Fritzen-Freire et.al. (2013), os micro-organismos probióticos encontram dificuldades de viabilidade perante as condições de temperatura e pressão osmótica durante o processo de secagem por atomização. Quando a secagem por *spray* é utilizada, normalmente, uma grande parte da atividade probiótica é perdida depois de algumas semanas de armazenamento à temperatura ambiente.

5.1.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 5 apresenta o termograma de calorimetria diferencial de varredura das microcapsulas composta por goma arábica – maltodextrina /*L. helveticus* e pelo complexo goma arábica – maltodextrina, após a secagem *spray drying* a 70 °C.

Figura 5. Termograma de Calorimetria Diferencial de Varredura das microcápsulas compostas por goma arábica-maltodextrina/*L. helveticus* e por goma arábica-maltodextrina, após a secagem em *spray drying* a 70 °C.



Observando-se a Figura 5 é possível verificar a presença de dois picos endotérmicos referentes a temperatura de fusão do sólido cristalino obtido (T_m). O pico na temperatura de 165 °C corresponde a amostra contendo o probiótico e em 178 °C sem probiótico. A adição do micro-organismo diminui sensivelmente a temperatura de fusão do complexo, porém essa diferença não implicará na utilização do mesmo no produto chocolate. Os resultados obtidos de T_m corroboram com a futura utilização destes complexos na etapa de temperagem do chocolate onde os mesmos serão adicionados. A temperagem é realizada a uma temperatura próxima de 30 °C. Deste modo, acredita-se que o probiótico não será liberado para o meio quando submetido a essa condição de processamento do produto.

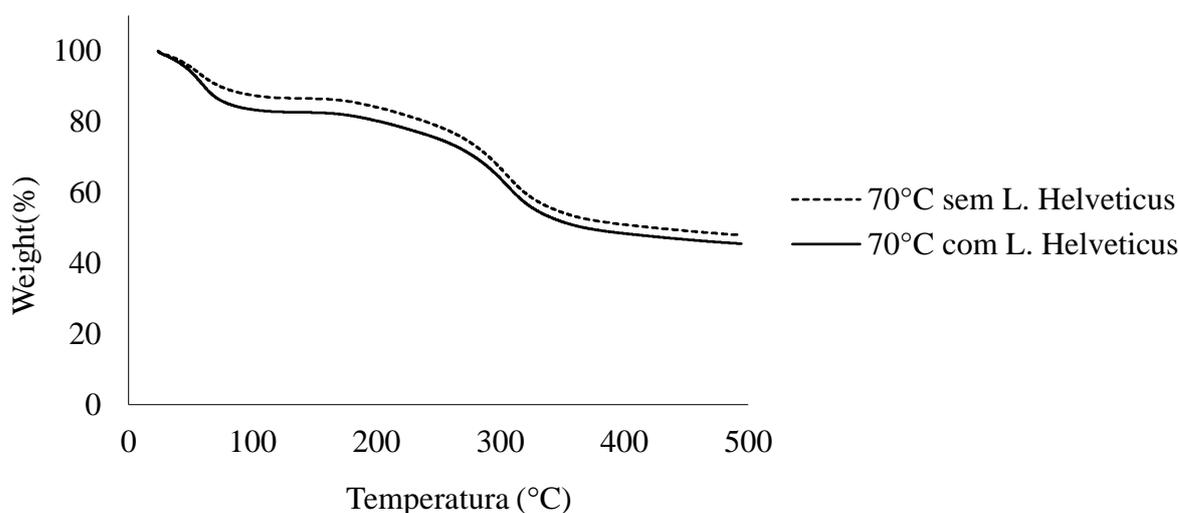
A maltodextrina e goma arábica, componentes principais na proporção no pó, apresentam temperaturas de transição vítrea de 162 °C e 280 °C, respectivamente (KUROZAWA et al., 2009). Segundo estudos realizados por Rubiano et. al. (2015) o produto encapsulado, ou seja, d-limoneno apresenta uma diminuição devido à presença de componentes e ao seu baixo peso molecular. Igualmente, a temperatura de transição vítrea obtida para o produto, garante sua estabilidade durante o armazenamento, já que as temperaturas estão abaixo de 40 °C, o que se pode, também, visualizar nesse estudo.

5.1.3.3 Análise termogravimétrica (ATG)

A análise termogravimétrica (ATG) é realizada para verificar a perda de massa de um material em função da temperatura variação à qual está exposta, fornecendo informações sobre sua estabilidade térmica. A relevância desta informação está nas operações aplicadas ao material fornecido, envolvendo troca de calor, como pasteurização, forneamento e cozimento (LECHEVALIER et al., 2017; MOHAMAD e MOHAMAD, 2016).

A Figura 6 apresenta o termograma dos resultados obtidos da análise ATG para as microcápsulas (com e sem probiótico) submetidas a secagem em *spray drier* a 70 °C.

Figura 6. Termograma de termogravimetria das microcápsulas do complexo goma arábica-maltodextrina/*L. helveticus* e do complexo goma arábica-maltodextrina submetidos a secagem por *spray drying* a 70 °C.



De acordo com a Figura 6 observa-se que o comportamento é similar, ou seja, a perda de massa foi proporcional em ambas as microcápsulas (com e sem o probiótico). As curvas mostram que inicialmente tem-se uma perda de aproximadamente 15% referente a umidade relacionada com a utilização do tampão fosfato, comprovando o resultado de umidade obtido através da análise de infravermelho (Tabela 7) na faixa compreendida entre 90 – 95 °C. Observa-se, também, uma perda de massa em torno de 50%, referente ao agente encapsulante e ao probiótico na faixa de temperatura compreendida entre 160 – 350 °C. Após esta faixa de temperatura não é observado mais nenhuma perda de massa.

No trabalho de Pinto et al. (2015) com micro-organismo probiótico *Bifidobacterium BB-12* microencapsulado por *spray drying* utilizando soro de leite líquido obtido por nanofiltração,

acrescido ou não de inulina e polidextrose (prebióticos), como agentes encapsulantes, puderam observar nas análises térmicas uma perda de umidade, liberação de água, em menor temperatura que o presente trabalho, entre 30 °C e 105 °C, o que sugere maior estabilidade térmica da goma arábica e da maltodextrina.

Segundo estudos realizados por Carvalho et al. (2019) a goma arábica foi considerada o material que apresenta maior estabilidade térmica, no entanto, a substituição da goma arábica por amidos modificados, em geral, contribuiu para diminuir a estabilidade térmica das micropartículas.

5.1.3.4 Caracterização Morfológica (MEV)

As microcápsulas da matriz M1/*L. helveticus* apresentaram um formato arredondado e partículas com tamanhos similares, sem poros ou rachaduras e também com a presença de algumas concavidades ou achatamentos na superfície (Figura 7). As microcápsulas da matriz CPM2/ *L. helveticus* possui um formato diferenciado em relação a CPM1/ *L. helveticus*, mas ambas se parecem em relação as suas concavidades e achatamentos (Figura.8). As concavidades ou achatamentos presentes nas superfícies das capsulas são típicas de produtos secos por *spray drying* (FRITZEN- REIRE et al., 2013; NUNES et al., 2018), normalmente resultantes das altas temperaturas de secagem ou, também, dependem do tipo de material encapsulante utilizado no processo (LIAN et al., 2002).

As micrografias, também, permitem a visualização de aglomerações de micropartículas externas às esferas. O comportamento é similar das microcápsulas goma arábica-maltodextrina/*L. helveticus* quando se comparou com as micropartículas de goma arábica-maltodextrina. Foi possível visualizar com clareza o envolvimento completo do probiótico pela matriz (Figura 7), em cujas imagens com aumentos de 20.000, 10.000 e 1.000 vezes se observou um sistema de "colmeias irregulares", tornando presumível a existência de uma proteção física às células por meio dos materiais encapsulantes (goma arábica-maltodextrina). Da mesma forma para a matriz CPM2/*L. helveticus* visualizou-se a formação de mesma morfologia, conforme a Figura 8.

Figura 7. Micrografias eletrônicas das microcápsulas do complexo goma arábica-maltodextrina (CPM1)/*L. helveticus* (aglomerado de microcápsulas de 20 μ m (a), 10 μ m (b) e 1 μ m (c)) e do complexo goma arábica-maltodextrina (100 μ m (d), 10 μ m (e) e 1 μ m (f)).

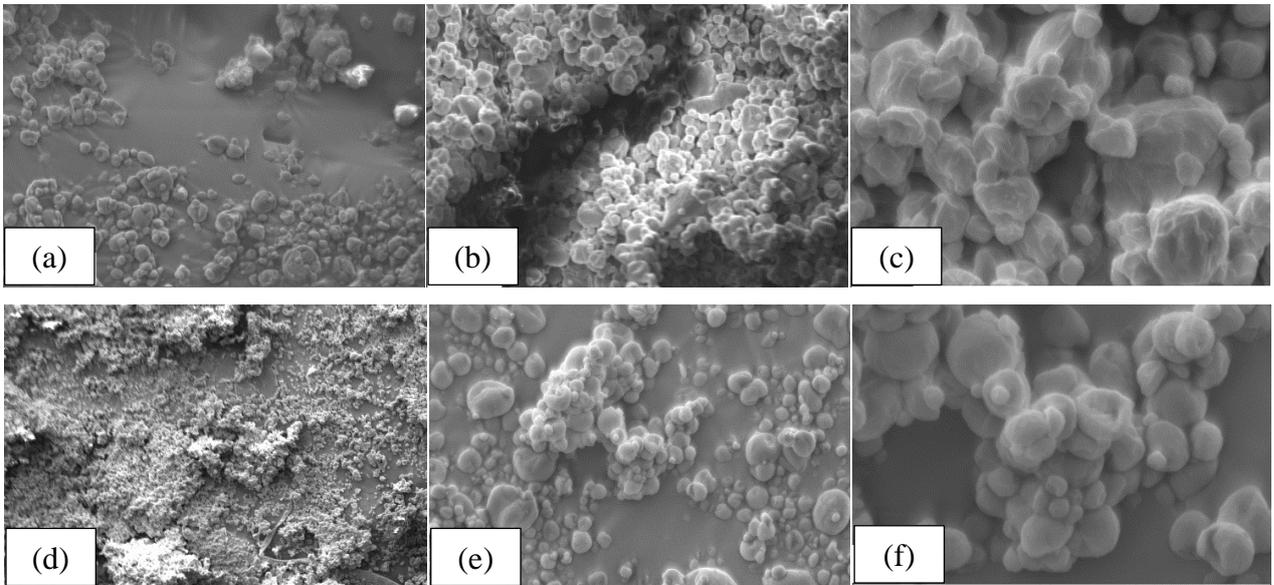
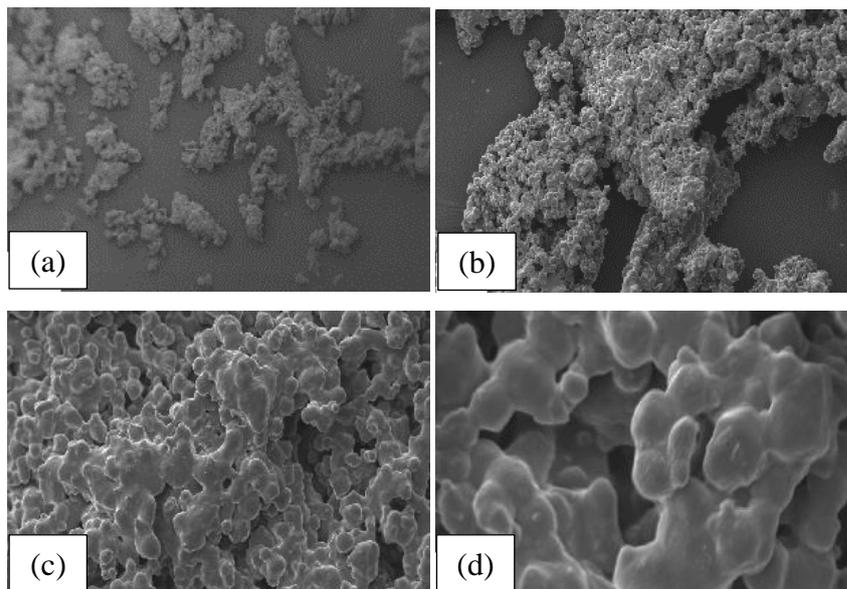


Figura 8. Micrografias eletrônicas das microcápsulas do complexo 30% leite em pó + 19% maltodextrina + 19% trealose + 20% frutoligossacarídeo + 10% amido + 2% tween 0,1% (CPM2) /*L. helveticus* (aglomerado de microcápsulas de 200 μ m (a), 100 μ m (b) e 20 μ m (c)).



O tamanho médio das partículas das microcápsulas do complexo goma arábica – maltodextrina /*L. helveticus* e do complexo goma arábica – maltodextrina foram de 2,60 μ m ($\pm 0,60$) e 3,04 μ m ($\pm 0,81$), respectivamente. De acordo com Kurozawa et al. (2009), maiores concentrações agentes encapsulantes na solução promovem um aumento no tamanho das

partículas. No entanto, vale a pena mencionar que as micropartículas obtidas pelo secador por pulverização apresentaram um tamanho de partículas menores e o formato esférico das micropartículas hidrofóbicas pode facilitar a sua incorporação nos alimentos devido à redução da tensão superficial entre a microcápsula e o alimento, refletindo em maior fluidez e escoamento do material (CHEN e CHEN, 2007; BURGAIN et al., 2011).

5.1.3.5 Resistência do probiótico encapsulado na matriz CPM2 sob diferentes condições de stress ao pH, NaCl, sacarose e temperatura

Sob condições simuladas avaliou-se se a matriz CPM2 protege o probiótico sob condições de stress ao pH (2 a 7), NaCl (3 a 9%), sacarose (10 a 45%) e de incubação na temperatura de 50 °C. A Tabela 8 apresenta a resistência do probiótico encapsulado na matriz CPM2 sob diferentes condições de stress ao pH, NaCl e sacarose.

Tabela 8. Resistência do probiótico (log UFC/g) encapsulado na matriz CPM2 sob diferentes condições de stress ao pH, NaCl e sacarose após 3 h de incubação.

Condições de estresse	Contagem do probiótico (log UFC/g)		
	0 h	3 h	
pH	2,0	8,02 ^{aA} ± 0,02	7,69 ^{bB} ± 0,09
	4,5	8,25 ^{Aa} ± 0,05	8,22 ^{aA} ± 0,06
	7,0	8,15 ^{Aa} ± 0,15	8,04 ^{aA} ± 0,08
NaCl	3%	8,93 ^{Aa} ± 0,28	8,53 ^{bA} ± 0,02
	6%	8,50 ^{aB} ± 0,01	8,38 ^{Aa} ± 0,10
	9%	8,43 ^{aB} ± 0,05	8,11 ^{bB} ± 0,06
Sacarose	10%	8,20 ^{aA} ± 0,05	8,13 ^{aA} ± 0,08
	25%	8,02 ^{aB} ± 0,02	8,01 ^{aA} ± 0,01
	45%	7,91 ^{aC} ± 0,04	7,39 ^{bB} ± 0,09

*Média ± desvio padrão seguida de letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam haver diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

A resistência do *L. helveticus* encapsulado em pH 2,0 foi de aproximadamente 96% após 3h de incubação, demonstrando diferença significativa ($p < 0,05$) no tempo de incubação em quando comparado ao pH 4,5 e 7,0. Porém, nos pH 4,5 e 7,0 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na contagem após 3 h de incubação e entre os pH avaliados. Esses resultados assemelham-se as encontrados por Silva (2016), que avaliou a resistência do *L. acidophilus*

LA3 livre em pH 2,0 que foi de aproximadamente 60%, após 3 h de ensaio, enquanto os métodos de encapsulação protegeram as células probióticas apresentando sobrevivência superior a 95%. No pH 4,5, ambos os métodos de encapsulação protegeram *L. acidophilus* LA3, assim os valores determinados após 3 h de análise, não foram estatisticamente diferentes. Por outro lado, as populações de probióticos não encapsuladas reduziram significativamente ($p > 0,5$) considerando a contagem das populações de probióticos no tempo inicial. No pH 7,0 não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) nas contagens das populações de probióticos recobertos por interação eletrostática, demonstrando que o método de encapsulação protegeu os probióticos. Entretanto, as contagens das populações dos probióticos não encapsulados ou encapsulados por *spray chilling* apresentaram diferenças significativas após 3 h. Todavia, no pH 7,0 pelo menos 90% das populações de probióticos sobreviveram ao final da análise.

Ainda no estudo de Silva (2016), quando foi usado o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 não encapsulado em pH 2, a sobrevivência dos probióticos foi de aproximadamente 55%, após 3h de ensaio. Os métodos de encapsulação utilizados pelo autor foram eficientes para a proteção do micro-organismo, pois a resistência foi acima de 90%. Entre os métodos de encapsulação estudados, a partícula lipídica recoberta por interação eletrostática de polímeros foi mais efetiva, porque não houve diferença significativa dos probióticos encapsulados comparados à população inicial ($p < 0,05$). A influência do pH 4,5 para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 livre ou encapsulado, dessa forma, a sobrevivência para os probióticos livres foi de 85%, enquanto para as células encapsuladas foi acima de 95%. Por outro lado, no pH 7 a sobrevivência foi superior para todos os tratamentos (>90%), e não foi observada diferença significativa para os probióticos encapsulados.

Fávaro-Trindade e Grosso (2000) avaliaram a tolerância dos probióticos livres ou encapsulados, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, em esferas de alginato de cálcio, em valores de pH similares ao estômago. No pH 2, os probióticos livres e encapsulados foram resistentes, sendo que ambas as populações de probióticos reduziram aproximadamente 1 log UFC/mL. Resultados similares foram determinados por Chotiko e Sathivel (2016), que encapsularam *Lactobacillus plantarum* por gelificação ionotrópica combinando pectina e farelo de arroz. No pH 3,0 após 2 h de ensaio, a redução das células livres foi de 1 log UFC/g demonstrando boa resistência, entretanto, a encapsulação utilizando os polímeros foi mais efetiva para a proteção das células, que não reduziram a população inicial.

Portanto, a matriz M2 foi efetiva para a proteção do probiótico, especialmente para o pH 2,0 que foi a condição mais drástica para o probiótico estudada, apesar de demonstrar diferença significativa ($p < 0,05$) entre a população de probiótico inicial, a taxa de sobrevivência

foi de aproximadamente 96%. Por outro lado, no pH 4,5 e 7,0 o probiótico demonstrou estabilidade após 3h de incubação, com taxa de sobrevivência superior a 98%.

O efeito do cloreto de sódio (NaCl) foi avaliado nas concentrações 3%, 6% e 9%, como pode ser visualizado na Tabela 8. As contagens das populações mantiveram-se praticamente estáveis sem reduções consideráveis. As populações de probiótico encapsulado na matriz M2 em meio contendo 9% de NaCl reduziram aproximadamente 0,4 log UFC/g das células viáveis, demonstrando que a matriz protege o probiótico nessas condições. Apesar desses resultados serem positivos, a concentração de 9% de NaCl não é utilizada em alimentos, ainda mais com as políticas de incentivo da redução dos níveis de sódio em alimentos processados. Portanto, a intenção da análise da resistência dos probióticos em 9% de NaCl foi avaliar se mesmo em condições mais drásticas a matriz M2 pode preservar os probióticos do meio, provando assim que a matriz composta por 30% leite em pó + 19% maltodextrina + 19% trealose + 20% frutoligossacarídeo + 10% amido + 2% tween 0,1% e o método de encapsulação por *spray dryer* é eficaz para a proteção do micro-organismo estudado, podendo ser aplicado em alimentos que apresentam NaCl em sua composição, como produtos cárneos, queijos, etc.

A contagem de *L. helveticus*, na concentração de 3% de NaCl, apresentaram redução de aproximadamente 0,4 log UFC/g após 3 horas de ensaio, valores similares aos encontrados no estudo realizado por Silva (2016) onde a contagem de *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* livres, na concentração de 3% de NaCl, apresentaram redução de aproximadamente 0,3 log UFC/g e 0,5 log UFC/g das células viáveis, após 3 h de ensaio.

Outros trabalhos avaliaram a resistência dos probióticos livres ou encapsulados em meio salino. Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014) encapsularam *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus paraplantarum* por coacervação complexa utilizando isolado de proteína do soro de leite e goma arábica. A tolerância em soluções salinas foi avaliada, e a encapsulação protegeu as células probióticas em diferentes concentrações de NaCl. As populações de probióticos não encapsulados em meio contendo 9% de NaCl reduziram aproximadamente 6 log UFC/g das células viáveis. Entretanto, para os probióticos encapsulados, as populações de probióticos reduziram entre 3-2,5 log UFC/g das células viáveis.

Concentrações de sacarose podem afetar a sobrevivência da população de probióticos, pois a mudança da osmolaridade do meio compromete algumas funções essenciais das células (SUNNY-ROBERTS e KNORR, 2009). Além disso, as estruturas das partículas podem ser alteradas no meio contendo carboidratos de baixo peso molecular, alterando a hidratação dos polissacarídeos e proteínas (COMUNIAN et al., 2016). Portanto, essa análise também deve ser

considerada previamente a aplicação em alimento que contenha sacarose, como o chocolate branco. Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que a encapsulação foi eficiente para manter as contagens das populações do probiótico na concentração de 10% e 25% já em alta concentração de sacarose (45%), a redução da contagem das populações de probiótico foi maior de 1 log UFC/g. Entretanto, mesmo após 3 h de incubação a redução foi superior a 7 log UFC/g, sendo superior a mínima dose indicada para o consumo (7 log UFC/g). Esses resultados nos mostram que o *L. helveticus* tem uma sobrevivência a sacarose, porém menor quando comprado ao NaCl, o que faz com que o mesmo possa ser indicado para uso em produtos açucarados, como em chocolate. Outros trabalhos verificaram a influência das soluções açucaradas sob a viabilidade dos probióticos. Sunny-Roberts e Knorr (2009) avaliaram a tolerância de *Lactobacillus rhamnosus* em diferentes concentrações de sacarose, e observaram que concentrações acima de 1,2 M reduziram a viabilidade dos probióticos.

Tratamentos térmicos são responsáveis por reduzir as contagens das populações dos probióticos, entretanto, foi investigado se a microencapsulação poderia protegê-los a 50 °C. A Tabela 9, apresenta as contagens das populações dos probióticos encapsulados na matriz CPM2 a 50 °C durante 1 h de ensaio.

Tabela 9. Resistência do probiótico (log UFC) encapsulado na matriz CPM2 incubado a 50 °C por 30 e 60 min.

Condições de estresse	Contagem do probiótico (UFC/g)		
	0 min	30 min	60 min
Temperatura (50°C)	8,12 ^a ± 0,08	7,43 ^b ± 0,18	7,37 ^b ± 0,05

*Média ± desvio padrão seguida de letras minúsculas diferentes nas linhas indicam haver diferença significativa (Teste de Tukey, p < 0,05).

As contagens das populações probióticas diminuem com o passar do tempo de incubação a 50 °C, sendo que as mesmas diferiram estatisticamente (p < 0,05) após 30 min de incubação a 50 °C, porém após 60 min não há diferença significativa (p > 0,05) em relação ao tempo 30 min. A taxa de sobrevivência após 30 e 60 min de incubação a 50 °C foi de 91,5% e 90,8%, respectivamente.

No estudo realizado por Silva (2016) as contagens dos probióticos diferiram após 60 min de ensaio sendo que quando comparou o probiótico encapsulado e na forma livre encontrou contagens superiores para os probióticos encapsulado. As taxas de sobrevivência dos probióticos não encapsulados foram 80% e 76%, enquanto os probióticos encapsulados apresentaram taxas de sobrevivência acima de 90%.

Wang et al. (2015) avaliaram o efeito da pasteurização HTST (*high temperature short time*), sobre *Lactobacillus kefiranofaciens* encapsulados usando a mistura de alginato de sódio, goma gelana e leite desnatado. Após o aquecimento, os probióticos livres não sobreviveram ao procedimento, enquanto a contagem da população do probiótico encapsulado foi de 7,54 log UFC/g.

5.2 Formulação de chocolate branco com probiótico

A Figura 9 apresenta o aspecto visual do chocolate branco formulado com probiótico (*L. helveticus*) livre (A) e encapsulado em matriz de goma arábica-maltodextrina (B). As Amostras apresentaram-se visualmente com aspecto similar, com brilho característico de tempera adequada, o qual é comprovado com análise da cor objetiva L^* por colorímetro (CIELAB) e com demais determinações analíticas (pH, umidade, A_w , acidez).

Figura 9. Chocolate branco formulado com probiótico *L. helveticus* livre (a) e encapsulado (b).



5.3 Caracterização do chocolate

O chocolate contendo o probiótico encapsulado com a matriz M1 (CPM1) e com a matriz M2 (CPM2), probiótico livre (CPL) e sem o probiótico (CSP) foi caracterizado em relação a sua atividade água, umidade, pH, acidez, índice de cor (L^* , a^* , b^* , cromaticidade C^*) e contagem de probiótico durante o armazenamento a 25°C.

5.3.1 Atividade Água (Aw)

A Tabela 10 apresenta os valores de atividade água referentes as amostras com e sem probiótico encapsulado nas matrizes M1e M2, bem como do probiótico na sua forma livre durante o período de armazenamento a 25 °C.

Tabela 10. Atividade de água do chocolate branco sem probiótico, com probiótico encapsulado com a matriz M1 e a matriz M2 e na forma livre.

Armazenamento (dias)	Atividade de água*			
	CSP	CPL	CPM1	CPM2
0	0,411 ^{eB} ± 0,001	0,371 ^{gD} ± 0,001	0,405 ^{dC} ± 0,001	0,495 ^{aA} ± 0,001
15	0,461 ^{cC} ± 0,001	0,486 ^{cA} ± 0,001	0,480 ^{aB} ± 0,001	-
30	0,439 ^{dD} ± 0,000	0,493 ^{bB} ± 0,001	0,442 ^{cC} ± 0,001	0,498 ^{aA} ± 0,001
45	0,490 ^{bA} ± 0,001	0,475 ^{dB} ± 0,001	0,456 ^{bC} ± 0,001	-
60	0,409 ^{fD} ± 0,001	0,495 ^{aA} ± 0,001	0,459 ^{bC} ± 0,001	0,485 ^{bB} ± 0,001
75	0,493 ^{aA} ± 0,001	0,454 ^{eB} ± 0,001	0,446 ^{cB} ± 0,005	0,454 ^{dB} ± 0,001
90	0,440 ^{cB} ± 0,000	0,426 ^{fC} ± 0,001	0,448 ^{cA} ± 0,001	0,452 ^{dA} ± 0,002
100	0,469 ± 0,001	-	-	0,465 ^c ± 0,002

*Média seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas que indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey).

Chocolates tem baixa atividade de água, ou seja, faixa compreendida entre 0,30 a 0,40 (GUTIÉRREZ, 2017). A presença de água livre no chocolate poderia umedecer os cristais de açúcar presentes, promovendo sua migração para a superfície do chocolate causando *sugar bloom*, que pode ser percebida pelo consumidor devido a mudanças na aparência e sensorialmente (VERDE et.al., 2021).

A Aw pode afetar a viabilidade do probiótico encapsulado uma vez que os micro-organismos podem permanecer metabolicamente ativos em altos valores de Aw, ou em estado latente em baixos valores de Aw (SILVA, 2016).

Apesar do chocolate branco apresentar um ligeiro aumento na atividade de água durante seu tempo de armazenamento os resultados ficaram abaixo de 0,5 o que contribui para a segurança microbiológica do produto a formulação controle no geral, quando comparada com as formulações adicionadas de probiótico, apresentou atividade de água inferior, pois o probiótico contém água na sua composição. Esses resultados assemelham-se com os encontrados no estudo realizado por Silva (2016) que comparou a amostra controle sem adição

de probiótico com a amostras adicionadas de *L. acidophilus* na forma livre e encapsulado bem como *B. animalis subsp* na sua forma livre e adicionada de probiótico. Vesterlund, Salminen e Salminen (2012) avaliou o impacto da atividade de água em matriz de linhaça triturada com probiótico *Lactobacillus rhamosus GG*, secada a 57 °C em estufa de laboratório, esses autores relataram Aw de aproximadamente 0,11.

Reshma et.al. (2018) avaliou Aw em chocolate ao leite adicionado de probiótico e encontrou um pequeno aumento na atividade de água durante os 180 dias de armazenamento, mas também foi menor que 0,6. Na pesquisa realizada por Verde et.al. (2021) que estudaram a estabilidade do chocolate ao leite com fibras higroscópica durante seu armazenamento encontraram Aw entre 0,20 e 0,43 o que se assemelha com os resultados que encontramos quando adicionamos probiótico no chocolate.

5.3.2 Umidade

A Tabela 11 apresenta os valores de umidade referentes as amostras de chocolate branco com probiótico encapsulado com as matrizes CPM1 e CPM2 bem como na sua forma livre e a amostra sem probiótico.

Tabela 11. Umidade do chocolate sem probiótico, com probiótico encapsulado com as matrizes CPM1 e CPM2 e na forma livre.

Armazenamento (dias)	Umidade* (%)			
	CSP	CPL	CPM1	CPM2
0	0,98 ^{dC} ± 0,07	3,96 ^{aA} ± 0,04	3,09 ^{aB} ± 0,03	1,11 ^{cC} ± 0,00
15	2,08 ^{aC} ± 0,01	4,34 ^{aA} ± 0,06	3,07 ^{aB} ± 0,16	-
30	1,83 ^{abB} ± 0,17	2,39 ^{bA} ± 0,10	2,23 ^{cA} ± 0,02	1,90 ^{bB} ± 0,19
45	1,88 ^{abC} ± 0,18	4,22 ^{aA} ± 0,04	2,76 ^{bB} ± 0,10	-
60	2,19 ^{aB} ± 0,05	4,26 ^{aA} ± 0,75	3,20 ^{aAB} ± 0,01	1,85 ^{cC} ± 0,07
75	1,90 ^{abD} ± 0,23	4,13 ^{aA} ± 0,94	2,65 ^{bB} ± 0,05	1,96 ^{aC} ± 0,08
90	1,69 ^{bC} ± 0,01	2,45 ^{bB} ± 0,18	2,54 ^{bA} ± 0,10	1,21 ^{dD} ± 0,02
100	1,43 ^{cB} ± 0,04	-	-	1,83 ^{cA} ± 0,02

*Média seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas que indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey).

Os chocolates são produtos de baixa umidade e a absorção de água pode causar mudanças nas características sensoriais e tecnológicas. A formulação com adição do probiótico na forma livre não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) com o passar dos dias de armazenamento, porém quando comparada com as amostras onde adicionou-se o probiótico encapsulado CPM1 e CPM2 apresenta diferença significativa. A umidade da amostra sem adição de probiótico (CSP) apresenta valores menores, provavelmente o probiótico está influenciando no aumento dos valores de umidade do produto final, também pode-se observar que a cápsula protege o produto em relação a umidade pois o chocolate com probiótico encapsulado na matriz CPM1 e CPM2 apresentaram umidade menor quando comparado ao chocolate que foi utilizado o probiótico na forma livre. Quando se comparou as capsulas CPM1 e CPM2 observou-se que a CPM2 apresentou menor umidade o que é um resultado excelente para o chocolate que possui no tempo 0 dias umidade menor que 1%. Através desses resultados pode-se observar que a capsula CPM2 apresenta maior resistência o processo de encapsulamento.

Verde et.al. (2021) usou em sua pesquisa os mesmos parâmetros (tempo e temperatura) na etapa de conchagem para chocolates com e sem fibras, causando um ligeiro aumento no teor de umidade inicial em comparação com o chocolate tradicional. Homayouni et al. (2019) otimizou o processo usando um moinho de bolas para diminuir o teor de umidade de chocolates com adição de ingredientes higroscópicos.

No estudo realizado por Reshma et.al. (2018) o chocolate ao leite tradicional não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) no teor de umidade em qualquer ponto de avaliação para qualquer uma das três embalagens utilizadas. O chocolate com inulina em BOPP / White BOPP e celofane diferiu em seus teores de umidade daqueles em BOPP/met BOPP após 120, 210 e 270 dias ($p < 0,05$) e apresentou um aumento significativo ($< 0,05$) na umidade a partir de 150 dias de armazenamento

5.3.3 pH

A Tabela 12 apresenta os valores de pH referentes as amostras de chocolate branco com probiótico encapsulado com as matrizes CPM1 e CPM2 bem como na sua forma livre e a amostra sem probiótico.

Tabela 12. pH do chocolate sem probiótico, com probiótico encapsulado e na forma livre.

Armazenamento (dias)	pH*			
	CSP	CPL	CPM1	CPM2
0	6,66 ^{bdB} ± 0,06	6,28 ^{abD} ± 0,04	6,86 ^{abA} ± 0,02	6,38 ^{bc} ± 0,04
15	6,81 ^{abA} ± 0,04	6,30 ^{ab} ± 0,03	6,79 ^{ca} ± 0,01	-
30	6,67 ^{bcA} ± 0,04	5,92 ^{dc} ± 0,06	6,74 ^{da} ± 0,01	6,37 ^{bb} ± 0,01
45	6,74 ^{abcB} ± 0,08	6,21 ^{abC} ± 0,06	6,88 ^{caA} ± 0,00	-
60	6,50 ^{da} ± 0,10	6,05 ^{cb} ± 0,07	6,40 ^{ea} ± 0,00	6,50 ^{aa} ± 0,04
75	6,59 ^{cdB} ± 0,04	6,19 ^{bd} ± 0,01	6,71 ^{da} ± 0,04	6,45 ^{ac} ± 0,01
90	6,84 ^{caA} ± 0,02	6,10 ^{cc} ± 0,00	6,83 ^{bcA} ± 0,03	6,31 ^{bcB} ± 0,06
100	6,77 ^{abcA} ± 0,07	-	-	6,26 ^{cb} ± 0,01

*Média seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas que indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey).

O pH, pode interferir na estrutura do chocolate, bem como na viabilidade do probiótico, o qual pode afetar a parede celular do micro-organismo (KRULWICH, SACH e PADAN, 2011). No presente estudo, o pH das amostras de chocolate foram avaliados por um período de 100 dias e os resultados são apresentados na Tabela 12. Todas as formulações de chocolate apresentaram variação num intervalo de 5,92 – 6,98, valores que estão próximos da faixa limite encontrada por Silva (2016) que foi de 5,66 – 5,87, que estudou a adição de probiótico em chocolate meio amargo num período de armazenamento de 120 dias. Quando se comparou os resultados de pH encontrados no chocolate encapsulado com as matrizes CPM1 e CPM2 observou-se que não apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) com o passar dos dias de armazenamento, o que indica que nenhuma das cápsulas afetou o pH do chocolate.

No estudo realizado por Reshma et al. (2018), o pH do chocolate ao leite foi avaliado durante o período de armazenamento de 180 dias a 25 ° C, e o valor do pH do chocolate ao leite probiótico estava na faixa de 5,73-5,94, o que não foi estatisticamente significativo. Esses achados indicam que *L. plantarum* HM47 microencapsulado não afetou o pH, sugerindo que a atividade metabólica foi baixa durante todo o período de armazenamento em temperatura ambiente, provavelmente por estarem microencapsulados e também pela baixa atividade de água (A_w). Resultados semelhantes foram relatados por Valencia et al. (2016), que sugeriu que a sobremesa de leite cremoso contendo *Lactobacillus paracasei* exibia uma faixa de pH de 5,0-6,0. De acordo com Lahtinen et al., (2005), o pH ótimo para a maior parte do crescimento bacteriano está próximo da neutralidade e o crescimento é inibido em pH abaixo de 5,0.

5.3.4 Acidez

A Tabela 13 apresenta os valores de acidez referentes as amostras com e sem probiótico encapsulado nas matrizes CPM1 e CPM2 bem como o probiótico na sua forma livre.

Tabela 13. Acidez do chocolate sem probiótico, com probiótico encapsulado nas matrizes M1 e M2 e na forma livre.

Armazenamento (dias)	Acidez* (%)			
	CSP	CPL	CPM1	CPM2
0	0,31 ^{aD} ± 0,02	0,87 ^{aB} ± 0,02	0,77 ^{aC} ± 0,00	0,97 ^{aA} ± 0,01
15	0,24 ^{bcB} ± 0,01	0,71 ^{cA} ± 0,01	0,64 ^{bA} ± 0,05	-
30	0,26 ^{bd} ± 0,02	0,70 ^{cB} ± 0,01	0,66 ^{abC} ± 0,01	0,79 ^{bA} ± 0,02
45	0,20 ^{ceB} ± 0,02	0,60 ^{dA} ± 0,00	0,62 ^{bA} ± 0,01	-
60	0,23 ^{bcdC} ± 0,01	0,56 ^{eB} ± 0,01	0,55 ^{bcB} ± 0,09	0,71 ^{dA} ± 0,01
75	0,18 ^{ed} ± 0,01	0,59 ^{deB} ± 0,00	0,46 ^{cC} ± 0,02	0,74 ^{cA} ± 0,00
90	0,20 ^{deC} ± 0,01	0,79 ^{bA} ± 0,01	0,65 ^{bB} ± 0,03	0,74 ^{cA} ± 0,02
100	0,44 ^B ± 0,00			0,79 ^{bA} ± 0,02

*Média seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas que indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey e/ou *t-student*).

A viabilidade das bactérias lácticas é afetada por diferentes fatores, um deles é a acidez do produto final. Entretanto, esse fator é fortemente influenciado pelo tipo de bactéria láctica adicionada ao produto. Urnau et al. (2012) verificaram boa sobrevivência de *Lactobacillus paracasei*, isolado de leite fermentado comercial, após exposição a pH 3,0, por 6 horas.

A acidez na amostra sem probiótico apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) com o passar dos dias de armazenamento, o que também ocorre na amostra com probiótico encapsulado CPM1 e CPM2, já a amostra com probiótico livre não difere entre si no decorrer do armazenamento. Observa-se resultados similares entre as amostras com adição do probiótico encapsulado CPM1 e CPM2 e na forma livre. Quando se comparou com a amostra sem probiótico, percebe-se que esta apresenta valores menores, pois o probiótico está aumentando a acidez do produto. Ao analisar a interação das matrizes com a acidez percebe-se que a matriz CPM2 apresenta valores superiores em relação a matriz CPM1, porém ambas não diferem estatisticamente entre si no decorrer do armazenamento. Messa et.al (2019), que desenvolveu um alimento probiótico de leite de coco encontrou valores de acidez entre 0,11 e 0,14%.

5.3.5 Índices de cor L*

A análise de cor foi realizada durante o período de estocagem das amostras que foi de 100 dias, sendo que a Tabela 14 nos mostra os resultados obtidos.

Tabela 14. Índices de cor L*, a*, b* e croma C do chocolate sem probiótico (CSP), com probiótico encapsulado nas matrizes M1 (CPM1) e M2 (CPM2) e na forma livre (CPL).

Armazenamento (dias)	Parâmetros de cor	Amostra**			
		CSP	CPM1	CPM2	CPL
0	L*	82,97 ^{eA} ± 0,18	82,97 ^{cA} ± 0,01	75,68 ^{bC} ± 0,05	81,40 ^{aB} ± 0,05
	a*	-1,41 ^{eD} ± 0,01	0,17 ^{cC} ± 0,04	5,52 ^{bA} ± 0,04	4,30 ^{eC} ± 0,11
	b*	22,38 ^{bD} ± 0,03	23,09 ^{bC} ± 0,02	25,33 ^{cA} ± 0,09	24,91 ^{bB} ± 0,31
	C*	22,42 ^{dC} ± 0,03	23,10 ^B ± 0,02	25,34 ^{cA} ± 0,06	24,92 ^A ± 0,35
15	L*	85,88 ^{cA} ± 0,21	81,84 ^{dB} ± 0,03	-	74,52 ^{dC} ± 0,29
	a*	-1,57 ^{fC} ± 0,01	1,80 ^{eB} ± 0,04	-	4,80 ^{cA} ± 0,03
	b*	23,95 ^{aB} ± 0,02	23,72 ^{aC} ± 0,02	-	25,09 ^{bA} ± 0,04
	C*	24,00 ^b ± 0,02	23,73 ^c ± 0,02	-	25,10 ^a ± 0,02
30	L*	84,65 ^{dB} ± 0,67	87,93 ^{aA} ± 0,20	75,30 ^{bC} ± 0,31	75,68 ^{bC} ± 0,20
	a*	-1,31 ^{dC} ± 0,03	1,22 ^{dB} ± 0,22	5,38 ^{cA} ± 0,04	5,56 ^{aA} ± 0,03
	b*	23,42 ^{bC} ± 0,31	21,58 ^{dD} ± 0,20	27,98 ^{bA} ± 0,04	25,62 ^{aB} ± 0,20
	C*	23,43 ^{bcC} ± 0,4	21,59 ^D ± 0,02	27,99 ^{bA} ± 0,02	25,63 ^B ± 0,04
45	L*	86,31 ^{bcA} ± 0,02	83,84 ^{bB} ± 0,48	-	74,12 ^{dC} ± 0,29
	a*	-1,56 ^{fC} ± 0,02	1,25 ^{dB} ± 0,06	-	4,67 ^{dA} ± 0,02
	b*	23,67 ^{bA} ± 0,05	18,00 ^{fC} ± 0,13	-	21,19 ^{dB} ± 0,00
	C*	23,68 ^{bcA} ± 0,02	18,01 ^C ± 0,03	-	21,20 ^B ± 0
60	L*	86,77 ^{abcA} ± 0,07	80,11 ^{cC} ± 0,05	76,47 ^{aB} ± 0,42	75,07 ^{bcD} ± 0,10
	a*	-1,01 ^{cD} ± 0,00	2,69 ^{bC} ± 0,01	5,63 ^{bA} ± 0,05	4,72 ^{dB} ± 0,02
	b*	22,67 ^{bB} ± 0,17	22,47 ^{cB} ± 0,03	30,33 ^{aA} ± 0,65	21,73 ^{cC} ± 0,01
	C*	22,68 ^B ± 0,02	22,48 ^B ± 0,03	30,34 ^{aA} ± 0,02	21,74 ^C ± 0,02
75	L*	86,89 ^{abA} ± 0,48	81,39 ^{dB} ± 0,16	76,09 ^{aC} ± 0,06	72,94 ^{eD} ± 0,38
	a*	-0,67 ^{bD} ± 0,02	2,48 ^{bC} ± 0,03	5,66 ^{bA} ± 0,09	4,62 ^{dB} ± 0,02
	b*	17,70 ^{cD} ± 0,46	21,09 ^{eB} ± 0,01	29,56 ^{aA} ± 0,16	20,05 ^{eC} ± 0,16
	C*	17,71 ^{eD} ± 0,02	21,08 ^B ± 0,02	29,56 ^{aA} ± 0,02	20,06 ^C ± 0,02
90	L*	87,46 ^{aA} ± 0,06	81,50 ^{dB} ± 0,26	-	72,84 ^{cC} ± 0,04
	a*	-0,27 ^{aC} ± 0,01	3,01 ^{aB} ± 0,02	-	5,22 ^{bA} ± 0,00
	b*	17,76 ^{cC} ± 0,02	22,45 ^{cA} ± 0,00	-	21,88 ^{eB} ± 0,00
	C*	17,76 ^{eC} ± 0,02	22,45 ^A ± 0,02	-	21,89 ^B ± 0,02
100	L*	83,10 ^{eA} ± 0,25	-	74,69 ^{bB} ± 0,21	-
	a*	-1,37 ^{fB} ± 0,01	-	6,04 ^{aA} ± 0,30	-
	b*	26,95 ^{aB} ± 0,37	-	30,08 ^{aA} ± 0,49	-
	C*	29,8 ^{aA} ± 0,02	-	30,10 ^{aA} ± 0,04	-

**Média seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas que indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey e/ou *t-student*).

Na análise de cor, o valor do parâmetro L*, que indica luminosidade, ou seja, quanto mais próximo de zero mais escura é a amostra, ao analisarmos os índices de cor, observa-se que no decorrer do tempo de armazenamento as amostras de chocolate branco na matriz CPM2 bem como a amostra com probiótico em sua forma livre apresentaram diminuição da cor branca original do chocolate, fator esse que está associado a composição da matriz e a coloração do probiótico livre.

Para os parâmetros de cromaticidade (a*, b*, *c), é possível afirmar que ambas as amostras apresentaram-se nas regiões do verde e do amarelo confirmando assim as características observadas nos produtos.

5.4 Avaliação da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado em amostras de chocolate branco durante a estocagem a 25 °C

A viabilidade do probiótico nas amostras de chocolate branco encapsulados com as matrizes CPM1 e CPM2 foram avaliadas durante 100 dias de estocagem a 25 °C, os resultados podem ser visualizados na Tabela.15.

Tabela 15. Avaliação da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado em amostras de chocolate branco durante a estocagem a 25 °C.

Armazenamento (dias)	Contagem do probiótico* (log UFC/g)		
	CPL	CPM1	CPM2
0	9,30 ^{aA} ± 0,04	8,95 ^{aB} ± 0,01	9,22 ^{aA} ± 0,02
15	8,48 ^{bA} ± 0,01	8,00 ^{bB} ± 0,04	-
30	8,40 ^{bB} ± 0,08	7,98 ^{bC} ± 0,19	9,26 ^{aA} ± 0,10
45	8,32 ^{bA} ± 0,06	7,93 ^{bB} ± 0,03	-
60	7,95 ^{cA} ± 0,10	7,68 ^{cB} ± 0,08	7,92 ^{bA} ± 0,20
75	7,04 ^{dA} ± 0,12	6,93 ^{dA} ± 0,08	6,98 ^{bA} ± 0,12
90	6,59 ^{eB} ± 0,08	6,00 ^{eB} ± 0,05	6,94 ^{bA} ± 0,01
100	-	-	4,76 ^c ± 0,26

*Média seguida de letras minúsculas/maiúsculas iguais nas colunas/linhas, que indicam não haver diferença significativa a nível de 95% (Teste de Tukey).

Durante a estocagem houve redução significativa ($p < 0,05$) na contagem das populações de probióticos tanto para a capsula CPM1 quanto para a cápsula CPM2. A forma livre e a encapsulada M1 apresentam comportamento similar com o passar do tempo de estocagem. A cápsula M2 manteve a contagem superior ($p < 0,05$) até 60 dias, porém após 75 dias o

comportamento foi similar ao da capsula CPM1 e do probiótico na forma livre. No chocolate branco para ser considerado com características de probiótico (6-7 log UFC/g) e com alegação funcional, o período máximo de armazenamento a 25 °C seria de aproximadamente 90 dias, ao adicionar inicialmente 9 log UFC/g de *L. helveticus* no produto.

No chocolate branco, em barras, (sem probiótico) normalmente a vida de prateleira é de 8 a 12 meses. A redução significativa da população do *L. helveticus* poderá estar associada a diminuição da resistência vinculada a sacarose e/ou aos demais constituintes do chocolate (manteiga de cacau, leite, vanilina e emulsificante), pois conforme foi verificado anteriormente (Tabela 8) à medida que se aumentava a concentração de sacarose (10, 25 e 45%) houve redução na sobrevivência do micro-organismo. O *L. helveticus* com contagem inicial de 9 log UFC/g pode ser recomendado em produtos à base de chocolate branco (bombons recheados, trufas, etc), com características probiótica, por um período de 90 dias de armazenamento a 25 °C. Para o incremento do período de armazenamento, contagens iniciais deverão ser superiores a 9 log UFC/g de *L. helveticus* no produto.

Ao comparar os resultados aos obtidos por Kemsawasd, Chaikham e Rattanasena (2016) que encapsularam *Lactobacillus casei* 01 e *Lactobacillus acidophilus* LA5 por *spray drying* utilizando maltodextrina e leite desnatado, e incorporaram as partículas probióticas obtidas em chocolate amargo, ao leite e branco. No tempo inicial as contagens dos probióticos em chocolate eram de aproximadamente 8 log UFC/g e após 40 dias de estocagem a 25 °C, a enumeração de *L. acidophilus* estava abaixo do limite de detecção, e as amostras de chocolate adicionadas de *L. casei* apresentaram contagens de aproximadamente 3 log UFC/g. Portanto, comparando esses resultados com o presente trabalho, a prévia microencapsulação por *spray drier* da matriz CPM2 do probióticos para incorporação em amostra de chocolate branco, manteve a viabilidade dos probióticos encapsulados por um período maior.

No estudo de Silva (2016), durante a estocagem não houve redução significativa das populações de probióticos adicionada de *B. animalis* subsp. *lactis* BLC1 não encapsulado, apresentando contagem de aproximadamente 7,7 log UFC/g. A formulação que foi acrescentada da população de *L. acidophilus* livre, obteve contagem de 7,3 log UFC/g das células viáveis, não havendo diferença significativa no período de 120 dias de estocagem em relação a formulação contendo *B. animalis* subsp. *lactis* não encapsulado. Após 60 dias de estocagem, a viabilidade dos probióticos encapsulados foi reduzida, e a enumeração ficou abaixo do limite de detecção do método (2,7 log UFC/g) no período de 120 dias.

Mandal et al. (2012) microencapsularam *Lactobacillus casei* NCDC 298 utilizando alginato de sódio, em seguida as partículas probióticas foram adicionadas em chocolate ao leite,

e como amostra controle foi adicionada a mesma cepa não encapsulada em chocolate. Durante a estocagem dos produtos a 7 °C por 60 dias, foi verificado que a microencapsulação não prolongou a viabilidade dos probióticos, comparado ao tratamento controle. Esses resultados são similares ao presente trabalho, que verificou que a microencapsulação não prolongou a viabilidade das células quando aplicados em chocolate por um período maior que 90 dias.

No entanto, Nebesny et al. (2007) produziram amostras de chocolate amargo probiótico com *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, que foram estocadas pelo período de 12 meses a 30, 18 e 4 °C e as contagens permaneceram estáveis (6 – 7 log UFC/g) durante o período de estocagem.

O modelo de Weibull (PELEG e COLE, 1998) foi empregado para descrever as curvas de sobrevivências não log lineares do *L. helveticus* no chocolate branco (forma livre - CPL, encapsulado M1 – CPM1 e M2 – CPM2) e está representado pela Equação (1). As curvas e os parâmetros que predizem a sobrevivência de *L. helveticus* foram obtidas com o auxílio do software STATISTICA versão 5.0 (Statsoft Inc, USA).

$$\log\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{\beta}\right)^\alpha \quad (1)$$

Onde: N é o número de microrganismos no instante t; N₀ é o número de microrganismos no tempo inicial; α é o fator de forma; β é o fator de escala e pode ser definido como “o tempo para uma redução decimal” se α=1.

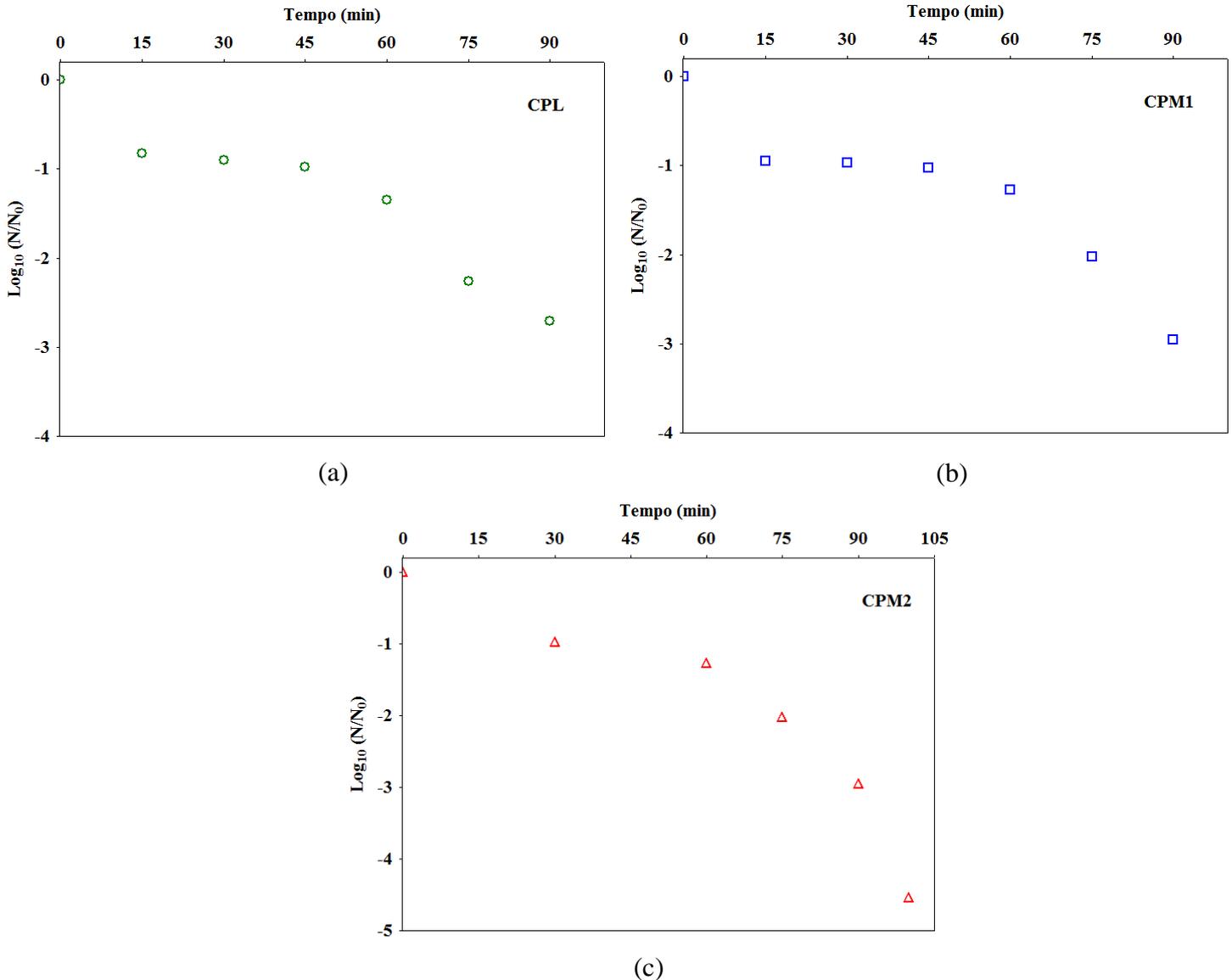
A Tabela 16 apresenta os valores dos parâmetros α e β do modelo de Weibull de sobrevivência no chocolate branco do *L. helveticus* livre (CPL) e encapsulado na matriz M1 (CPM1) e M2 (CPM2) e análise estatística do ajuste (R²). Os parâmetros fator de forma (α) e fator de escala (β) do CPL e CPM1 não apresentaram variações relevantes, demonstrando um comportamento similar. Os coeficientes estatísticos R² demonstram um bom ajuste dos dados experimentais e a capacidade preditiva do modelo primário de Weibull.

Tabela 16. Parâmetros α e β do modelo de Weibull de sobrevivência do *L. helveticus* livre (CPL) e encapsulado na matriz M1 (CPM1) e M2 (CPM2) e análise estatística do ajuste (R²).

Amostras	α	β	R ²
CPL	1,066	36,949	0,959
CPM1	1,060	36,553	0,930
CPM2	1,384	43,221	0,970

A Figura 10 apresenta as curvas que predizem a sobrevivência de *L. helveticus* livre (CPL) e encapsulado M1 (CPM1) e M2 (CPM2).

Figura 10. Cinéticas de sobrevivência para o *L. helveticus* livre – CPL (a) e encapsulado na matriz M1-CPM1 (b) e M2-CPM2 (c).



Todas as curvas de sobrevivência apresentam a mesma tendência, com a concavidade voltada para baixo, comprovando o que o parâmetro de forma já havia indicado ($\alpha > 1$). E o parâmetro β que é o fator de escala, ou seja, o tempo para uma redução decimal, no qual o chocolate com a matriz M2 (CPM2) tem-se um tempo superior ($\beta = 43,22$), quando comparado ao CPL e CPM1 (Tabela 16) para uma redução decimal, indicando que a matriz CPM2 ocasionou proteção superior a CPM1 para o *L. helveticus*.

5.5 Análise multivariada do chocolate: Correlação de Pearson e Análise dos Componentes Principais (ACP)

A Tabela 17 e Figura 11 apresentam a correlação de Pearson e análise dos componentes principais (ACP) das variáveis físico-químicas do chocolate branco, sem probiótico (CSP), adicionado de probiótico livre (CPL) e encapsulado com a Matriz M1 (CPM1) e com a matriz M2 (CPM2) no 0°, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 100° dia de armazenamento, respectivamente.

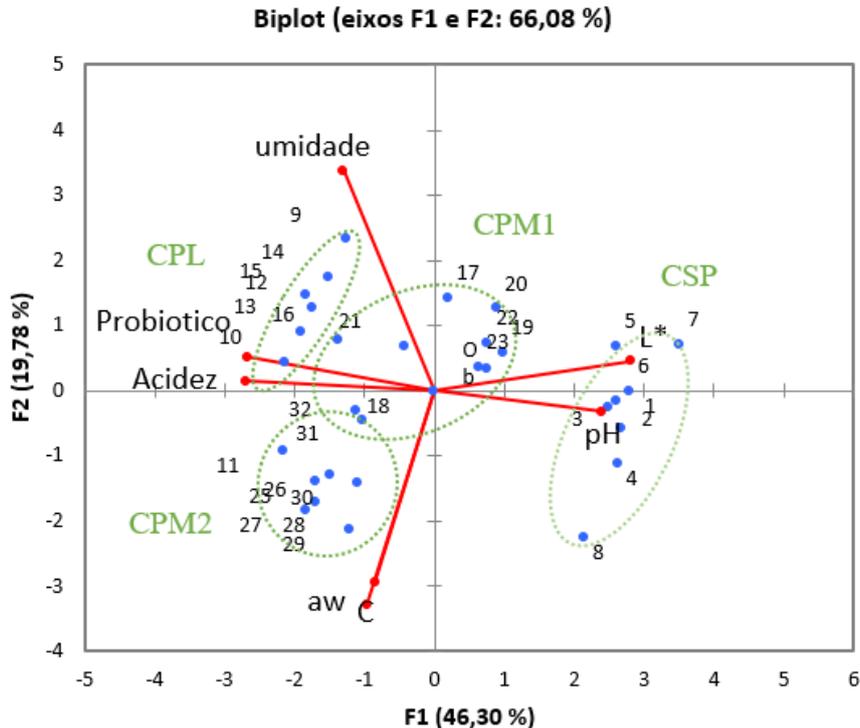
Tabela 17. Matriz de correlação (r) de Pearson para as variáveis atividade de água (aw), umidade, pH, acidez, cor L* e croma C* e contagem do probiótico do chocolate branco, sem probiótico, adicionado de probiótico livre e encapsulado (Matriz M1 e M2) no 0°, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 100° dia de armazenamento.

Variáveis	Aw	Umidade	pH	Acidez	L*	C	Probiótico
Aw	1						
Umidade	-0,131	1					
pH	-0,180	-0,336	1				
Acidez	0,046	0,216	-0,478	1			
L*	-0,290	-0,247	0,799**	-0,712**	1		
Croma C	0,221	-0,203	-0,124	0,250	-0,255	1	
Probiótico	0,189	0,422	-0,420	0,882**	-0,608**	0,203	1

**Os valores são diferentes de 0 e $> 0,45$ com um nível de significância $\alpha = 0,05$.

Os valores obtidos por meio de correlação de Pearson (Tabela 17) confirmam a relação entre os parâmetros observados na análise de componentes principais (Figura 11), sendo que a concentração de probiótico está correlacionada positivamente ($p < 0,05$) com acidez ($r = 0,882$) e negativamente com a cor L* ($r = -0,609$, demonstrando que o probiótico influencia na acidez e no brilho do chocolate branco, ou seja, aumentando a acidez e diminuindo o L*. Da mesma forma, a cor L* foi correlacionado positivamente com o pH ($r = 0,799$) e conseqüentemente negativa com a acidez ($r = -0,712$).

Figura 11. Análise dos Componentes Principais (ACP) das amostras de chocolate branco, sem probiótico, adicionado de probiótico livre e encapsulado (Matriz M1 e M2) no 0°, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 100° dia de armazenamento, respectivamente.



Legenda: **CSP** - Chocolate sem probiótico (1 – 0 dia; 2 – 15° dia; 3 – 30° dia; 4 – 45° dia, 5 – 60° dia, 6 – 75° dia; 7 – 90° dia; 8 – 100° dia); **CPL** - Chocolate com probiótico livre (9 – 0 dia; 10 – 15° dia; 11 – 30° dia; 12 – 45° dia, 13 – 60° dia, 14 – 75° dia; 15 – 90° dia; 16 – 100° dia); **CPM1** - Chocolate com probiótico encapsulado M1 (17 – 0 dia; 18 – 15° dia; 19 – 30° dia; 20 – 45° dia, 21 – 60° dia, 22 – 75° dia; 23 – 90° dia; 24 – 100° dia) e **CPM2** - Chocolate com probiótico encapsulado M2 (25 – 0 dia; 26 – 15° dia; 27 – 30° dia; 28 – 45° dia, 29 – 60° dia, 30 – 75° dia; 31 – 90° dia; 32 – 100° dia).

Na Análise dos Componentes Principais (ACP) (Figura 11), as variáveis são representadas como vetores, quanto mais longo o vetor, melhor a explicação da variabilidade entre as amostras de chocolate. A primeira (CP1) e segunda (CP2) dimensão explicaram 66,08 % da variância total. O componente principal 1 (CP1) respondeu por 46,30 %, enquanto que o componente principal 2 (CP2) por 19,78 %. Observa-se que há uma boa discriminação entre as amostras de chocolate com probiótico e sem a presença do probiótico. As amostras CPL e CPM1 localizam-se mais próximas do vetor (variável) umidade e a amostra CSP das variáveis pH e L*.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um novo produto envolve diversas etapas, nesse estudo trabalhamos com uma inovação, o desenvolvimento de um chocolate branco agregando funcionalidade através o uso de um probiótico. O objetivo foi alcançado pois as partículas produzidas pelo método – *spray dryer* protegeram os probióticos em condições quando comparadas com o probiótico livre. O método utilizado para encapsulamento do probiótico mostrou-se eficaz.

Em relação a seleção das matrizes alimentícias estudadas (M1 e M2) para os Ensaio de secagem em *spray dryer* apresentaram bom desempenho no processo. A matriz M2 foi superior a M1 pois obteve-se uma maior proteção do probiótico quando comparada com a M1, fator esse que deve estar relacionado a sua composição (30% leite em pó + 19% maltodextrina + 19% trealose + 20% frutoligossacarídeo + 10% amido + 2% tween 0,1%) e capacidade de proteção.

As populações de probióticos não encapsulados se mantiveram durante o ensaio, porque as características físico químicas do chocolate, como pH, atividade de água, teor de gordura propiciaram um ambiente de manutenção das células probióticas. Entretanto, os probióticos encapsulados provavelmente não foram influenciados pela presença desses compostos, pois os micro-organismos estavam envolvidos na matriz carreadora, o que pode ser outra justificativa para a redução da viabilidade durante a estocagem.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliação *in vitro* da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado aos fluidos gastrointestinais simulados.

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

Investigar a cinética de liberação dos probióticos encapsulados.

Avaliar o *shelf life* do pó encapsulado em diferentes tipos de embalagens.

8 REFERÊNCIAS

- ABICAB, **Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados**. 2020. Disponível em: http://www.abicab.org.br/index_home.html. Acesso em: 31 de dezembro de 2020.
- ALVES, N. N.; MESSAOUD, G. B.; DESOBRY, S.; COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 45-54, 2016.
- ANDRADE, R. V.; SILVA, A. F.; MOREIRA, N. F.; SANTOS, H. P. S.; DANTAS, H. F.; ALMEIDA, I. F.; LOBO, L. P. B.; NASCIMENTO, M. A. Atuação dos Neurotransmissores na Depressão. **Revista Ciências Farmacêuticas**, Brasília. v. 1, n. 1. jan./mar. 2003.
- AREPALLY, D.; REDDY, R.S.; GOSWAMI, T.K. Studies on survivability, storage stability of encapsulated spray dried probiotic powder. **Current Research in Food Science**, v. 3, p. 235-242, 2020.
- ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: *Boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Nutr., Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P.C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana - Parte 2. **Revista Nutrir Gerais**, Ipatinga, v. 3, n. 4, p. 396-416, fev./jul. 2009.
- BAMPI, G. B.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L.; MATOS, F. E.; ANSOLIN, I. M. A.; POLETO, B. C.; COREZZOLLA, L. R.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Spray Chilling Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and Its Use in the Preparation of Savory Probiotic Cereal Bars. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 1422-1428, 2016.
- BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n. 2, p. 6, 2010.
- BARBOSA, F. H. F.; BAMBIRRA, F. H. S.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus sp.* da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* – avaliação *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em camundongos gnotoxênicos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Sergipe, v. 6, p. 1-8 2006.
- BARRO, N. P. R. **Desenvolvimento e caracterização de chocolate ao leite acrescido de extrato de erva-mate**, 2014. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, 2014.

- BASTOS, C. P. **Processamento de Chocolate**. Pelotas. 17f. Trabalho (Disciplina de Seminário) – Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, 2003.
- BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización del chocolate**. Zaragoza: Acribia S.A, 1994.
- BECKETT, S. T. **The science of chocolate**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 175p., 2009.
- BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; FISK, I. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology**, v. 31, n. 11, p. 1274-1283, 2013.
- BORGOGNA, M.; M. BELLICH; B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESARO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 416–423, 2010.
- BOSNEA, L. A.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2767-2781, 2014.
- BRAGANTE, A. G. **Desenvolvimento de produto na indústria de alimentos**. São Paulo, 1. ed., p. 208, 2015.
- BRASIL. ANVISA. **Resolução nº 2, de 7 de janeiro de 2002**. Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. 2002. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 03 de junho de 2017.
- BRASIL, ANVISA. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999**. Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 03 de junho de 2017.
- BRASIL, ANVISA. **Resolução - RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>, 2005. Acesso em 08 de junho de 2019.
- BREARTY, S.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; WALLACE, J. M.; STANTON, C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 599-610, 2001.
- BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 48, n. 5, p. 361-377, 2008.
- BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467– 483, 2011.
- BUSTAMANTE, M.; OOMAH, B. D.; RUBILAR, M.; SHENE, C. Effective *Lactobacillus platarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and

flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. **Food chemistry**, v. 216, p. 97-105, 2017.

CARVALHO, G. R.; FERNANDES, R. V. B.; SILVA, P. C.; DESSIMONI, A. L. A.; OLIVEIRA, C. R.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Influence of modified starches as wall materials on the properties of spray-dried lemongrass oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 4972-4981, 2019.

CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 44, p. 172-176, 1995.

CAVALHEIRO, F. G.; BAPTISTA, D. P.; GALLI, B. D.; NEGRÃO, F.; EBERLIN, M. N.; GIGANTE, M. L. High protein yogurt with addition of *Lactobacillus helveticus*: Peptide profile and angiotensin-converting enzyme ACE-inhibitory activity. **Food Chem**, v. 333, n. 127482, 2020.

CAVALHEIRO, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; MENEZES, M. F. S. C.; MENEZES, C. R.; FRIES, L. L. M. Encapsulação: alternativa para a aplicação de micro-organismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 37, p. 65-74, 2015.

CAVALHEIRO, C. P. **Probióticos encapsulados aplicados em produto cárneo**. 2016. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2016.

CHAGAS, V. S. **Microencapsulação por *spray drying* de bactéria láctica com potencial probiótico**, 2018. 47f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São João Del Rei, UFSJ, Divinópolis, 2018.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Curr Opin Biotechnol**, p.184-190, 2007.

CHAMPAGNE, C. P.; RAYMOND, Y.; GUERTIN, N.; BÉLANGER, G. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 109-117, 2015.

CHAMPAGNE, C. P. Recommendation for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 185-193, 2011.

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v. 25, n. 7-8, p. 1193-1201, jul. 2007.

CHEN, M. J.; CHEN, K. N. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, J. M. **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. Estados Unidos. p. 83-107, 2007.

CHENG, S. Y.; YUEN, C. W. M.; KAN, C. W.; CHEUK, K. K. L. Development of Cosmetic Textiles Using Microencapsulation Technology. **Research Journal of Textile and Apparel**, v. 12, p. 41–51, 2008.

CHOTIKO, A.; SATHIVEL, S. Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-bran-extract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 66, p. 420-427, 2016.

COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M. N. H. Revisão: Temperagem ou pré-cristalização do chocolate. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 7, n. 1, p. 23-30, 2004.

COMUNIAN, T. A.; GOMEZ-ESTACA, J.; FERRO-FURTADO, R.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAES, I. C. F.; CASTRO, I. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319-329, 2016.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.4, p. 1297-1303, jul./ago., 2004.

COSTA, G. M.; SILVA, J. V. C.; MINGOTTI, J. D.; BARÃO, C. E.; KLOSOSKI, S. J.; PIMENTEL, T. C. Effect of ascorbic acid of oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT**, v. 75, p. 195-201, 2017.

CRUXEN, C. E. S.; HOFFMAN, J. F.; ZANDONÁ, G. P.; FIORENTINI, A. M.; RAMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. 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, 2017.

DHONSI, D.; STAPLEY, A.G.F. The effect of shear rate, temperature, sugar and emulsifier on the tempering of cocoa butter. **Journal of Food Engineering**, v.77, n. 4, p. 936-942, 2006.

EDRIS, A. E.; KALEMBA, D.; ADAMIEC, J.; PIATKOWSKI, M. Microencapsulation of *Nigella sativa* oleoresin by spray drying for food and nutraceutical applications. **Food Chemistry**, London, v. 204, p. 326-333, 2016.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para a produção de chocolates**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2004.

EFRAIM, P. **Contribuição a melhoria da qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio de caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2009.

ETCHEPARE, M. de A.; NUNES, G.L.; NICOLOSO, B.R.; BARIN, J.S.; MORAES FLORES, E.M.; DE OLIVEIRA MELLO, R.; RAGAGNIN DE MENEZES, C. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. **LWT**, v. 117, n. 108601, 2020.

EVIVIE, S.E.; ABDELAZEZ, A.; LI, B.; BIAN, X.; LI, W.; DU, J.; HUO, G.; LIU, F. In vitro organic acid production and in vivo food pathogen suppression by probiotic *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. **Front. Microbiol**, v. 10, n. 782, 2019.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Londres, Ontário, Canadá: FAO/WHO, 11p., 2002.

FARAH, R. **Chocolate: Energia e saúde**. 151p. São Paulo: Alaúde Editorial. 2008.

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. 9, n. 4, p. 485-494, 2002.

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

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

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas e Aplicação Tecnológica de Bactérias Probióticas. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Rio de Janeiro: Rubio, p. 1-27, 2012.

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

FRITZEN-FREIRE, C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; PINTO, S. S.; MUÑOZ, I. B.; AMBONI, R. D. M. C. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT – Food Science Technol**, p. 39-44, 2013.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. 1990. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.

GALLINA, D. A.; BARBOSA, P. P. M.; ORMENESE, R. C. S. C.; GARCIA, A. O. Development and characterization of probiotic fermented smoothie beverage. **Revista Ciência Econômica**, v. 50, n. 3, Fortaleza, 2019.

GHARSALLAOUI, A.; GAËLLE, R. CHAMBIN, O.; VOLLEY, A., RÉMI, S. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, jul. 2007.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **Int J Food Sci Nutr**, p. 213-224, 1999.

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

GOSVAMI, K.T.; AREPALLY, D. Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. **Food Science and Technology**, v. 99, p. 583–593, 2019.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, 2004.

GUERIN, J.; PETIT, J.; BURGAIN, J.; BORGES, F. *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 193, p. 10-19, 2017.

GUTIÉRREZ, T.J. State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 1313-1344, 2017.

HADZIEVA, J.; MLADENOVSKA, K.; SIMONOSKA CRCAREVSKA, M.; GLAVAŠ DODOV, M.; DIMCHEVSKA, S.; GEŠKOVSKI, N.; GROZDANOV, A.; POPOVSKI, E.; PETRUŠEVSKI, G.; CHACHOROVSKA, M. *Lactobacillus casei* encapsulated in soy protein isolate and alginate microparticles prepared by spray drying. **Food Technol. Biotechnol.**, v.55, p.173-186, 2017.

HOJJATI, M.; BEHABAHANI, B.A.; FALAH, F. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*. **Microb. Pathog.**, v. 147, n. 104420, 2020.

HOMAYOUNI RAD, A., PIROUZIAN, H. R., TOKER, O. S., & KONAR, N. Application of simplex lattice mixture design for optimization of sucrose-free milk chocolate produced in a ball mill. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, n. 108435, 2019.

HUSSAIN, M.; EGAN, H.; KEYTE, R.; MANTZIOS, M. Exploring the effects of mindfulness and self-distancing on chocolate intake after a negative state affect. **Journal of Cognitive Enhancement**, v. 5, n. 15, 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed./1. ed. digital. São Paulo, 2008. 1020p.

JAIN, N.K. **Controlled and novel drug delivery**. Delhi, CBS Publishers & Distributors, 2004.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, **Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 6, 2009.

KEARNEY, N.; STANTON, C.; KELLY, J.; MENG, X. C. Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 684-689, 2009.

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, 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, 2014.

KLU, Y. A. K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 983-988, 2015.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3. jul./set., 2008.

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

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

KUMAR, L. R., CHATTERJEE, N. S., TEIPAL, C. S., VISHNU, K. V., ANAS, K. K., ASHA, K. K.; ANANDAN, R.; MATHEW, S. Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying: Characterization and oxidative stability studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1986-1995, 2017.

KUROZAWA, L.; PARK, K.; HUBINGER, M. Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. **Journal. Food Eng.**, v. 91, n. 2, p. 287-296, 2009.

LAHTINEN, S. J., GUEIMONDE, M., OUWEHAND, A. C., REINIKAINEN, J. P., SALMIEN, S. J. Probiotic bacteria may become dormant during storage. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1662–1663, 2005.

LALICIC-PETRONIJEVIC, J.; POPOV-RALKIC, J.; OBRADOVIC, D.; RADULOVIC, Z.; PAUNOVIC, D.; PETRUSIC, M.; PEZO, L. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NDFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 541-550, 2015.

LANNES, S. C. S.; RICHTER, M. Ingredientes usados na Industria de chocolates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, jul./set., 2007.

LECHEVALIER, V.; GUERIN, C.; ANTON, M. et al. Pasteurisation of liquid whole egg: Optimal heat treatments in relation to its functional, nutritional and allergenic properties. **Journal of Food Engineering**, v. 195, p. 137-149, 2017.

LEYLAK, C., ÖZDEMİR, K.S., GURAKAN, G.C., OGEL, Z.B. Optimisation of *spray drying* parameters for *Lactobacillus acidophilus* encapsulation in whey and gum arabic: Its application in yoghurt, **International Dairy Journal**, v. 112, n. 104865, 2020.

LI, W. F.; RAJPUT, I. R.; XU, X.; LI, Y. L.; LEI, J.; HUANG, Q.; WANG, M. Q. Effects of probiotic (*Bacillus subtilis*) on laying performance, blood biochemical properties and intestinal microflora of shaoxing duck. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 8, p. 583-589, 2011.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 79-86, 2002.

LIANG, X.; LV, Y.; ZHANG, Z.; YI, H.; LIU, T.; LI, R.; YU, Z.; ZHANG, L. Study on intestinal survival and cholesterol metabolism of probiotics. **LWT**, v. 124, n. 109132, 2020.

LIU, H.; CUI, S.W.; CHEN, M.; LI, Y.; LIANG, R.; XU, F.; ZHONG, F. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 59, p. 2863-2878, 2019.

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

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas a manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, 2001.

MADI, L.; COSTA, A. C. P. B.; REGO, R. A. **Brasil food trends 2020.** São Paulo: FIESP: ITAL, 2010.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, Philadelphia, v. 3, p. 1377–1397, 2011.

MANDAL, S.; HATI, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, R.; SINGH, K. Development of symbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 1031-1037, 2012.

MARINHO, J. F. U. **Desenvolvimento e avaliação de sorbets probióticos e simbióticos elaborados com polpa de Juçara (*Euterpe edulis*),** 2016. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, USP, Pirassununga, 2016.

MEDEIROS, A. C. L., THOMAZINI, M., URBANO, A., CORREIA, R. T. P., & FÁVARO-TRINDADE, C.S. Structural characterisation and cell viability of a spray dried probiotic yoghurt produced with goats' milk and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis (BI-07). **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 71–77, 2014.

MELO, L. L. M. M. **Perfil Sensorial como Ferramenta para o Desenvolvimento de chocolates ao Leite Diet em sacarose e Light em calorias contendo Substitutos da**

Sacarose e de Gordura. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas, 2008.

MESSA, S. P.; NESPOLO, C. R.; SEHN, C. P.; PINHEIRO, F. C.; FERREIRA, M. B.; SOARES, G. M. Desenvolvimento de alimento probiótico de leite de coco sem açúcar adicionado. **Contexto e Saúde**, v. 19, n. 37, p. 52-58, 2019.

MOHAMAD, S. F. S.; MOHAMAD, S. Study of calcination condition on decomposition of calcium carbonate in waste coke shell to calcium oxide using thermal gravimetric analysis. **Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 11, n. 16, 2016.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A.M.; KHOSROKHAVAR, R.; DA CRUZ, A.G. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Ann. Microbiol**, v. 61, p. 411-424, 2011.

MORENO, H. O.; KUNIGK, C. J. **Encapsulação e secagem de microrganismos probióticos.** In: Escola de Engenharia Mauá, 2014.

NACHTIGALL, A. M. **Processamento de chocolate.** Pelotas. 25f. Trabalho (Disciplina de Seminários) – Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, 1999.

NEBESNY, E.; ZYZELEWICZ, D.; MOTYL, I.; LIBUDZISZ, Z. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 33-42, 2007.

NUNES, G.L.; MOTTA, M. H.; CICHISKI, A. J.; WAGNER, R.; MULLER, R.; CODEVILLA, C. F.; SILVA, C. B.; MENEZES, C. R. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium* Bb-12 by spray drying and evaluation of its resistance in simulated gastrointestinal conditions, thermal treatments and storage conditions. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v.4 n. 6, 2018.

OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M. A.; SPOTO, M. H. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos.** Barueri: Manole, 2006.

OKURO, P. K; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.C.; LIBERAL, R.D.C.O.; FÁVARO – TRINDADE, C.S. Co- encapsulation of *Lactobacillus Acidophylus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 96-103, 2013.

OLIVARES A.; SILVA P. Viability dataset on microencapsulated probiotics: Sodium alginate viscosity effect. **Data in Brief**, v. 27, n. 104735, 2019.

PAULA, D.D.A.; MARTINS, E.M.F.; COSTA, N.D.A.; DE OLIVEIRA, P.M.; DE OLIVEIRA, E.B.; RAMOS, A.M. Use of gelatin and gum Arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 133, p. 722-731, 2019.

- PAULETTO, F. **Extração e Encapsulamento de Pigmentos da Casca de Jaboticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimento) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, 2016.
- PELEG, M., COLE, M.B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 38, n. 5, p. 353–380, 1998.
- PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276-1283, 2011.
- PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; VIEIRA, R. W. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT – Food Science Technology**, v. 64, n. 2, p. 1004-1009, 2015.
- PREMI, M.; SHARMA, H.K. Effect of different combinations of maltodextrin, gum Arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 105, p. 1232-1240, 2017.
- RÉ, I.M. Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes. **Ciência hoje, São Paulo**, p. 24-29, 2000.
- REIS, N. S.; MORAES, M. O. B.; LINS, R. P.; FILHO, E. S.; CARVALHO, E. A.; ROCHA, S. A. S.; GONÇALVES, B. H. R. F.; MELLO, D. L. N.; NETO, B. A. M. Produção de chocolate 70% massa de cacau enriquecido com óleo essencial das folhas de *Mentha arvensis*. **Brasilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51107-51123, 2020.
- RESHMA, B. N; PERIYAR, S. S; ANAND, B. P. Development of milk chocolate supplemented with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* HM47 and to determine the safety in a Swiss albino mice model. **Food Control**, v. 94, p. 300-306, 2018.
- RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424-431, 2014.
- RODRIGUES, F.J.; CEDRAN, M.F.; BICAS, J.L.; SATO, H.H. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications: a narrative review. **Food Res. Int.**, v. 137, n. 109682, 2020.
- ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spraydrying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1288-1294, 1990.
- ROZENFELD, H.; FORCELLINI, F. A.; AMARAL, D. C.; TOLEDO, J. C.; SILVA, S. L.; ALLIPRANDINI, D. H.; SCALICE, R. K. **Gestão de Desenvolvimento de Produtos: uma referência para a melhoria do processo**. São Paulo: Saraiva, 2006.

RUBIANO, K.; CÁRDENAS, J.; HÉCTOR, J.; VELÁSQUEZ, C. Evaluation Of Thermodynamic and Thermal Properties for D-Limonene Encapsulated by *Spray Drying*. **Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.**, v. 18, n. 2, p. 425-434, 2015.

SAAD, S. M. I; BEDANI, R; MAMIZUKA, E. M. Benefícios à saúde dos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I; CRUZ, A. G; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011.

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

SANCHEZ, C., NIGEN, M., TAMAYO, V. M., DOCO, T., WILLIAMS, P., AMINE, C.; RENARD, D. Acacia gum: History of the future. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 140–160, 2018.

SANTIVARANGKNA, C.; WENNING, M.; FOERST, P.; KULOZIK, U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 748-756, 2007.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de pimenta. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 26-30, 2000.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 193-202, 2010.

SILLICK, M; GREGSON, C.M. Spray chill encapsulation of flavors within anhydrous erythritol crystals. **LWT – Food Science and Technology**, v. 8, p. 107-113, 2012.

SILVA, M. P. **Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo contendo microorganismos probióticos na forma livre e encapsulada**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, USP, Pirassununga, 2016.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulação: conceitos, mecanismos, métodos e algumas aplicações em tecnologia de alimentos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, jul. 2014.

SILVA, M. N.; TAGLIAPIETRA, B.L.; RICHARDS, N.S.P.D.S. Encapsulation, storage viability, and consumer acceptance of probiotic butter. **LWT**, v. 139, n. 110536, 2020.

STEFÉ, C. A.; M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos – Artigo de revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 16-33, 2008.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 2º ed. Orlando Flórida: Academic press. 1993.

STRINGHETA, P. S.; OLIVEIRA, T. T.; GOMES, R. C., DO AMARAL M. P. H.; DE CARVALHO, A. F.; VILELA, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades

funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, 2007.

SUAVE, J; DALAGNOL, E.C; PEZZIN, A.T.P; SILVA, D.A.K; MEIER, M.M; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.12- 20, 2006.

SUNNY-ROBERTS, E. O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 209-214, 2009.

TAHERI, A.; JAFARI, S.M. Nanostructures of gums for encapsulation of food ingredients. In: **Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes**, Jafari, Press: Academic, 2019.

THARMARAJ, N. E SHAH, N.P. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2288-2296, 2003.

URNAU, D.; CIROLINI, A.; TERRA, N. N.; CAVALHEIRO, C. P.; MILANI, L. I. G; FRIES, L. L. M. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 384, n. 67, p. 5-10, 2012.

VALDUGA, A. T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J. R. D. Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, n. 2, Campinas, 2003.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extraction, spray drying and microencapsulating of 'Isabel' grape (*Vitis labrusca*) bagasse anthocyanin. **Ciênc. Agrotec.** v. 32, n. 5, Lavras, 2008.

VALENCIA, M. S; SALGADO, S. M; ANDRADE, S. A. C; PADILHA, V. M; LIVERA, A. V. S., & 512 STAMFORD, T. L. M. Development of creamy milk chocolate dessert added with fructooligosaccharide and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 104–109, 2016.

VANISK,I R.; CORTI, D.; DRUNKLER, D.A. Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8, n. 1, p. 156-184, jan./mar. 2017.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18 p. 714-728, 2008.

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 430-441, 2005.

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

VEMMER, M.; PATEL, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 380-389, 2013.

VERDE, A.B.; ALVIM, I.D.; LUCCAS, V., VERCELINO, A.R.M. Stability of milk chocolate with hygroscopic fibers during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 137, n. 110477, 2021.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in fraxseed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 319-321, 2012.

VISSOTO, F.Z.; LUCCAS, V.; BRAGAGNOLO, N.; TURATTI, J. M.; GRIMALDI, R.; FIGUEIREDO, M. S. Caracterização Físico-química e Reológica de Chocolates Comerciais tipo cobertura elaborados com gorduras alternativas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, p. 139-148, fev. 1999.

VIVEK, K., MISHRA, S., PRADHAN, R.C. Characterization of *spray dried* probiotic Sohiong fruit powder with *Lactobacillus plantarum*, **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, n. 108699, 2019.

VILLA, C. A.; ACOSTA-OTÁLVARO, E. V.; RADRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; MANO-RIVAS, J. C. Sucrose-free milk chocolate manufacture using bulking agents and a non-caloric sweetener. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, 2020.

WANG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, J.; GUI, M.; LI, P. Bacteriocin-producing probiotics enhance the safety and functionality of sturgeon sausage. **Food Control**, v. 50, p. 729-735, 2015.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 209-217, 2004.

ZHOU, T.; HUO, R.; KWOK, L.-Y.; LI, C.; MA, Y.; MI, Z.; CHEN, Y. Effects of applying *Lactobacillus helveticus* H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. **J. Dairy Sci.** v. 102, p. 223-235, 2019.

APÊNDICES

Apêndice A: Questionário Anônimo de Análise Sensorial

Informações para o(a) participante voluntário(a):

Você está convidado(a) a responder este questionário que faz parte da coleta de dados da pesquisa “**Microencapsulação de *Lactobacillus helveticus* e Aplicação em Chocolate Branco**” sob execução da aluna de Doutorado em Engenharia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos URI - Campus de Erechim, Najara Pinto Ribeiro Barro. A pesquisa está sob orientação dos Professores Dr.^a Eunice Valduga e Dr. Marcelo Mignoni. Caso você concorde em participar da pesquisa, leia com atenção os seguintes pontos: a) você é livre para, a qualquer momento, recusar-se a responder às perguntas que lhe ocasionem constrangimento de qualquer natureza; b) você pode deixar de participar da pesquisa e não precisa apresentar justificativas para isso; c) sua identidade será mantida em sigilo; d) caso você queira, poderá ser informado(a) de todos os resultados obtidos com a pesquisa, independentemente do fato de mudar seu consentimento em participar da pesquisa. **Esse Projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da URI – Campus de Erechim.**

Questionário:

1. Você está recebendo uma amostra de chocolate branco com agente encapsulante, por favor, prove e indique o quanto você gostou ou desgostou da IMPRESSÃO GLOBAL, utilizando a escala abaixo:

IMPRESSÃO GLOBAL

- () gostei muitíssimo
- () gostei
- () não gostei nem desgostei
- () desgostei
- () desgostei muitíssimo

COMENTÁRIOS:

Apêndice B: Artigo publicado

Biointerface Research in Applied Chemistry

Platinum Open Access Journal (ISSN: 2069-5837)

Article

Volume 11, Issue 4, 2021, 11221 - 11232

<https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1122111232>

Microencapsulation of Probiotic *Lactobacillus helveticus* with Different Wall Materials by Spray Drying

Najara Pinto Ribeiro Barro ¹, Leonardo Meirelles da Silva ¹, Guilherme de Souza Hassemer ¹, Elton Franceschi ², Rogério Luis Cansian ¹, Alexander Junges ¹, Geciane Toniazco Backes ¹, Jamile Zeni ¹, Rosicler Colet ¹, Marcelo Mignoni ¹, Eunice Valduga ^{1,*}

¹ Department of Food Engineering, URI – Erechim Av. Sete de Setembro, 1621, Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil, 99709-910, Brazil

² Center for Research on Colloidal Systems (NUESC), Institute of Research and Technology (ITP), Tiradentes University (UNIT), Aracaju, SE 49032-490, Brazil

* Correspondence: veunice@uricer.edu.br;

Scopus Author ID 23490413300

Received: 6.11.2020; Revised: 4.12.2020; Accepted: 7.12.2020; Published: 10.12.2020