



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**Produção de Alimentos Probióticos do Tipo
não Lácteo com Células de *Lactobacillus
acidophilus LA-5* e Chocolate**

Uberlândia - MG - Brasil

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**Produção de Alimentos Probióticos do Tipo não Lácteo
com Células de *Lactobacillus acidophilus LA-5* e
Chocolate**

Renata Cristina Teixeira

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Uberlândia - MG - Brasil

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

T266p Teixeira, Renata Cristina, 1987-
2012 Produção de alimentos probióticos do tipo não lácteo com células de *Lactobacillus acidophilus LA-5* e chocolate / Renata Cristina Teixeira. - 2011.
92 f. : il.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
Co-orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Probióticos - Teses. 3. *Lactobacillus acidophilus* - Teses. 4. Chocolate - Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 14 /12 /2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Orientador (PPGEQ/UFU)

Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso
Co-orientadora (PPGEQ/UFU)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Angélica Vieira
(PPGEQ/UFU)

Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira
(Instituto Nacional de Tecnologia, INT, Brasil)

Aos meus pais, meu marido e minha irmã, que têm sido minha motivação e
porto seguro em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho pela paciência e atenção permanentes em todas as etapas do trabalho.

À Lorena Gargano Machado, pela ajuda e companhia durante os experimentos.

À Tia Ione, pelo interesse e ajuda nos preparos dos bombons.

Ao meu marido Gabriel, pelo carinho e compreensão.

Aos meus pais, minha irmã e meu cunhado, pelo apoio incondicional.

Ao Senai/Cetal, pelo conhecimento e ajuda através dos Instrutores Gilson e Priscila nos teste sensoriais.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Chocolate.....	04
2.1.1. História.....	04
2.1.2. O Cacaueiro	06
2.1.3. Processamento do chocolate.....	07
2.1.4. A química do chocolate.....	11
2.1.5. Novidades do mercado mundial.....	14
2.2. Alimentos funcionais.....	15
2.2.1. Os probióticos.....	16
2.2.2. Estabilidade.....	19
2.3. Determinação de características físico-químicas do chocolate.....	24
2.4. Análise sensorial de chocolate.....	25
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Fermentações.....	30
3.2. Condições de preparação das células nas fermentações para uso nas formulações probióticas em barra.....	30
3.3. Formulações probióticas em bombom.....	31
3.4. Formulações probióticas em chocolate em barra.....	32
3.5. Estudo da formulação de chocolate em barra ao leite.....	32
3.6. Análise sensorial.....	33
3.6.1. Teste triangular.....	33
3.6.2. Teste afetivo.....	33

3.7. Quantificação do número de células.....	34
3.8. Atividade de água.....	35
3.9. Teor de Lipídeos.....	36
3.10. Tratamento estatístico dos dados.....	37
 CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	 38
4.1. Testes Preliminares.....	38
4.2. Avaliação cinética da morte celular	41
4.3. Avaliação da formulação de Chocolate ao leite (C2).....	46
4.3.1. Avaliação da cinética de crescimento celular em diferentes meios.....	46
4.3.2. Análise sensorial.....	51
 CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO.....	 59
 CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	 61
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 62
 ANEXO 1: Curvas de calibração da análise da atividade de água.....	 66
 ANEXO 2: Detalhamento do tratamento de dados do teste triangular.....	 67
 ANEXO 3: Interpretação do resultado de aceitação por escala hedônica.....	 73

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.1: Importação, exportação e saldo da balança comercial de chocolate sob todas as formas.....	01
Figura 1.2: Produção, consumo aparente, exportação e importação sob todas as formas.....	02
Figura 2.1: Cacau e incenso como oferendas do ritual de derramamento de sangue.	04
Figura 2.2: Ritual da Corte Espanhola: “Um cavaleiro e uma dama tomando chocolate”.....	05
Figura 2.3: Principais produtores de cacau.....	06
Figura 2.4: Desenvolvimento do cacau..... a) flor de cacau; b) fruto pequeno; c) fruto maduro.....	06
Figura 2.5: Fruto do cacau.....	07
Figura 2.6: Frutos da cacau com diferentes maturações.....	08
Figura 2.7: Processo de fermentação das amêndoas de cacau e cochas.....	08
Figura 2.8: Geração de produtos a partir da amêndoas de cacau.....	09
Figura 2.9: Diagrama esquemático do processo produtivo de chocolate.....	10
Figura 2.10: Composição média do chocolate ao leite, balanceamento entre os seus componentes.....	12
Figura 2.11: Potencial antioxidante do chocolate e alguns outros alimentos.....	13
Figura 2.12: Fotografia de Elie Mechnikoff (1845-1916).....	15
Figura 2.13: <i>Bifidobacterium</i>	17
Figura 2.14: <i>Lactobacillus</i>	17
Figura 2.15: Aplicação de probióticos na indústria alimentícia.....	18
Figura 2.16: Descrição da estabilidade do produto.....	20
Figura 2.17: Representação gráfica da função sobrevida.....	21
Figura 2.18: Representação gráfica da função densidade probabilidade.....	22
Figura 2.19: Representação gráfica da função risco.....	23
Figura 2.20: Metodologias de Análises Sensoriais.....	26
Figura 2.21: Modelo para realização do teste triangular.....	27
Figura 2.22: Modelo de escala hedônica.....	28
Figura 3.1: Sequência dos testes experimentais.....	29

Figura 3.2: Amostras codificadas oferecidas aleatoriamente aos candidatos.....	33
Figura 3.3: Ficha utilizada no teste afetivo.....	34
Figura 3.4: Procedimento para contagem de lactobacilos com utilização de NMP...	35
Figura 3.5: Procedimento para contagem de lactobacilos com utilização de placas..	35
Figura 4.1: Contagens celulares nas formulações B1, B2 e B3.....	38
Figura 4.2: Resultados das contagens celulares em triplicata das formulações B4, B5, B6 e B7 para 17 dias de armazenamento.....	39
Figura 4.3: Contagem celular em formulações C2, C3 e C4, após 16 dias de armazenamento.....	40
Figura 4.4: Intervalo dos dados experimentais: contagem celular em formulações C2, C3 e C4, após 16 dias de armazenamento.....	40
Figura 4.5: Síntese dos resultados preliminares.....	41
Figura 4.6: Resultado das contagens celulares em barras sem secagem prévia das células expressos em termos do valor médio e erro padrão.....	42
Figura 4.7: Contagem celular após a secagem das células em diferentes tempos.....	42
Figura 4.8: Resultado das contagens celulares em barras com secagem prévia das células por 2 horas expresso em termos do valor médio e erro padrão.....	43
Figura 4.9: Medidas das atividade de água.....	44
Figura 4.10: Resumo dos estudos realizados com formulações C1, C2, C3 e C4....	45
Figura 4.11: Cinética de crescimento celular da cepa LA 5 em diferentes meios....	46
Figura 4.12: Formulações de chocolate ao leite preparadas com células fermentadas em meios distintos.....	47
Figura 4.13: Função sobrevida para formulação preparada com células do meio fermentativo M1.....	48
Figura 4.14: Função sobrevida para formulação preparada com células do meio fermentativo M2.....	49
Figura 4.15: Função sobrevida para formulação preparada com células do meio fermentativo M3.....	49
Figura 4.16: Representação gráfica da função sobrevida ajustada pelo modelo de Weibull.....	50
Figura 4.17: Representação gráfica da função densidade probabilidade ajustada pelo modelo de Weibull.....	50
Figura 4.18: Representação gráfica da função risco ajustada pelo modelo de	

Weibull.....	51
Figura 4.19: Montagem das cabines de análise sensorial para realização do teste triangular.....	52
Figura 4.20: Amostra oferecidas aos candidatos no teste triangular.....	52
Figura 4.21: Perfil dos voluntários do teste triangular: sexo.....	52
Figura 4.22: Perfil dos voluntários do teste triangular: idade.....	53
Figura 4.23: Análise Sensorial: resultado do teste triangular.....	53
Figura 4.24: Amostra oferecidas ao candidatos no teste afetivo.....	54
Figura 4.25: Teste afetivo: degustação da amostra.....	55
Figura 4.26: Perfil dos voluntários teste afetivo: sexo.....	55
Figura 4.27: Perfil dos voluntários teste afetivo: idade.....	55
Figura 4.28: Teste afetivo: Frequênciia absoluta de escolha dos diferentes estados afetivos.....	56
Figura 4.29: Teste afetivo: Frequênciia relativa de escolha dos diferentes estados afetivos.....	57
Figura 4.30: Intenção de compra obtida juntamente com o teste afetivo.....	57
Figura 5.1: Conclusões do trabalho.....	60
Figura F1: Curva de calibração: primeiro dia.....	66
Figura F2: Curva de calibração: segundo dia.....	66
Figura F3: Representação gráfica Tabela A.1.....	69

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 2.1 - Processo de produção do chocolate.....	11
Tabela 2.2: Composição nutricional do chocolate ao leite.....	12
Tabela 2.3: Comparação entre os principais nutrientes dos chocolates amargo, ao leite e branco.....	12
Tabela 2.4: Metilxantina: conteúdo de chocolates e bebidas.....	14
Tabela 2.5. Linha de produtos “bem-estar”, apresentados pela Barry Callebaut.....	14
Tabela 2.6: Agentes probióticos definidos pela ANVISA.....	17
Tabela 2.7: Benefícios gerais atribuídos às <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i>	18
Tabela 2.8: Benefícios gastrointestinais e imunológicos associados ao consumo de <i>Lactobacillus acidofilus</i> LA-5.....	19
Tabela 2.9: Variáveis que afetam a estabilidade.....	20
Tabela 2.10: Equações da distribuição de Weibull.....	24
Tabela 3.1: Composição dos meios de cultura.....	30
Tabela 3.2: Formulações utilizadas –quantidades referentes a uma porção de 15g..	31
Tabela 3.3: Formulações de chocolate tipo barra.....	32
Tabela 3.4: Composição da solução redutora.....	34
Tabela 3.5: Relação de atividade de água de sais para construção de curva de calibração.....	36
Tabela 4.1: Avaliação visual das formulações.....	45
Tabela 4.2: Porcentagem de lipídeos pelo método em extrator Soxlet.....	45
Tabela 4.3: Parâmetros obtidos do ajuste de crescimento celular.....	47
Tabela 4.4: Função sobrevida ajustada pelo modelo não paramétrico de Kaplan Meier.....	48
Tabela 4.5: Ajuste da função sobrevida pelo modelo de Weibull.....	50
Tabela 4.6: Teste triangular (unilateral, $p = 1/3$). Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância a vários níveis de probabilidade.....	54
Tabela 4.7: Estatística descritiva da análise sensorial: teste afetivo.....	56
Tabela A.1: Cálculo para experimento com 16 provadores.....	68
Tabela A.2: Teste triangular (unilateral, $p = 1/3$). Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância a vários níveis de probabilidade.....	70

Tabela A.3: Dados experimentais do teste sensorial.....	72
Tabela A.4: Valores de q para teste de Tukey, nível de erro $\alpha = 5\%$, segundo o número de tratamentos P e graus de liberdade do resíduo n_1	74

LISTA DE SÍMBOLOS

- γ : parâmetro de forma da distribuição de Weibull
 λ : parâmetro de escala da distribuição de Weibull
 μ_m : velocidade de crescimento celular
 a_w : atividade de água
B1: formulação tipo bombom, recheio de coco (cultura mista)
B2: formulação tipo bombom, recheio de chocolate (cultura mista)
B3: formulação tipo bombom, recheio de leite em pó (cultura mista)
B4: formulação tipo bombom, recheio de coco, adição de ác. Ascóbico 0,0% (LA 5)
B7: formulação tipo bombom, recheio de coco, adição de ác. Ascóbico 0,04% (LA 5)
B8: formulação tipo bombom, recheio de coco, adição de ác. Ascóbico 0,08% (LA 5)
B9: formulação tipo bombom, recheio de coco, adição de ác. Ascóbico 0,15% (LA 5)
C1: chocolate branco (0% sólidos de cacau)
C2: chocolate ao leite (25% sólidos de cacau)
C3: chocolate meio amargo (53% sólidos de cacau)
C4: chocolate amargo (70% sólidos de cacau)
 c : velocidade de crescimento
D: tempo necessário para observar um decréscimo decimal na concentração celular
 $f(t)$: função densidade probabilidade
 $h(t)$: função risco
M1: meio fermentativo MRS
M2: meio fermentativo com glicose, levedo de cerveja e extrato de *Camellia sinensis*
M3: meio fermentativo com glicose e levedo de cerveja
 $m_{amostra}$: massa de chocolate pesada
 $m_{balão}$: massa do balão previamente seco
 $m_{balão+lipídeo}$: massa do balão com o resíduo da extração após a secagem
 $m_{lipídeos}$: massa de lipídeos extraída
 $N(t)$: número de células sobrevivente em um tempo superior a t
N: concentração celular (cel/g)
 N_0 : concentração celular inicial (cel/g); número de células total no tempo t=0
 $P(t)$: probabilidade de um micro-organismo sobreviver mais que um tempo t.
 P_v : pressão de vapor de água em equilíbrio com o alimento

P_v^{sat} : pressão de vapor de água em equilíbrio com água pura (pressão de saturação)

$S(t)$: função sobrevida no tempo t

X_0 : concentração celular inicial

X_m : concentração celular final

RESUMO

O conceito de alimentos funcionais surgiu com a perspectiva da inserção de substâncias e compostos biologicamente ativos que pudessem exercer efeito benéfico sobre a saúde. Entre os alimentos funcionais, os suplementos probióticos vem sendo cada vez mais estudados e utilizados no estabelecimento e melhora da saúde. Na presente dissertação, foram produzidas e avaliadas formulações probióticas de chocolate utilizando lactobacilos com especial destaque para a cepa *Lactobacillus acidophilus* LA 5. As preparações geradas foram avaliadas em termos da cinética de morte celular, análise de sobrevivência, propriedades sensoriais e físico-químicas. Os resultados mostram que: a) os diferentes tipos de formulações estudados são adequados para uso como probiótico, mas a adição de ácido ascórbico e do extrato de *Camellia sinensis* não se mostraram eficazes na melhora da sobrevida; b) os três meios usados na fermentação das células são apropriados para multiplicação das mesmas, sendo que o meio composto de levedo de cerveja e glicose se destacou, gerando produto mais estável; c) no teste sensorial, o chocolate com probiótico se diferiu sensorialmente do chocolate convencional, mas apresentou grande aceitação.

Palavras-chave: probióticos, *Lactobacillus acidophilus* LA 5 e chocolate.

ABSTRACT

The definition of functional food was born as substances and biologically active components that are added to food which offer the potential of enhanced health. In this way, probiotics are marketed as functional foods and have become increasingly used because of their hole for modify gut microflora and improve health. In present master dissertation, chocolate's probiotic formulations have been developed using lactobacilli with special focus on *Lactobacillus acidophilus* LA 5. The formulations were evaluated in terms of cell death kinetics, survival, physicochemical and sensory analysis. The obtained results have indicated that: a) chocolate-based products containing lactobacilli can be used for probiotic formulations, but the use of ascorbic acid and vegetable aqueous extract of *Camellia sinensis* reduced the stability of probiotic tested; b) three fermentation medium tested are adequate for fermentation, but fermentation broth composed by brewer's yeast and glucose presented the best results when compared with the others; c) there is difference in taste ($p<0.001$) among chocolate and probiotics chocolate, but chocolate containing probiotic is accepted by consumers.

Key-words: probiotic, chocolate, *Lactobacillus acidophilus* LA 5.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

As diferentes formas e sabores do chocolate são degustados por milhares de pessoas em um mercado mundial que em 2004 já ultrapassava 73,2 bilhões de dólares anuais e o consumo era estimado em 6,5 milhões de toneladas (BEGUM et al., 2007). Segundo a Associação Brasileira da Indústria do Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB), o Brasil é o quarto maior produtor de chocolate e possui saldo positivo na balança comercial desde 1999, como mostrado na Figura 1.1 que relaciona a exportação, importação e saldo da balança comercial brasileira do chocolate sob todas as formas. O país vem registrando um aumento tanto no consumo como na produção, conforme apresentado na Figura 1.2. A preferência da população pelo chocolate é parcialmente explicado pela docura, riqueza nutritiva e o bem estar associado ao consumo do mesmo.



Figura 1.1: Importação, exportação e saldo da balança comercial de chocolate sob todas as formas.

Fonte: ABICAB. Disponível em <<http://www.abicab.org.br/>>. Consulta em: nov/2011.

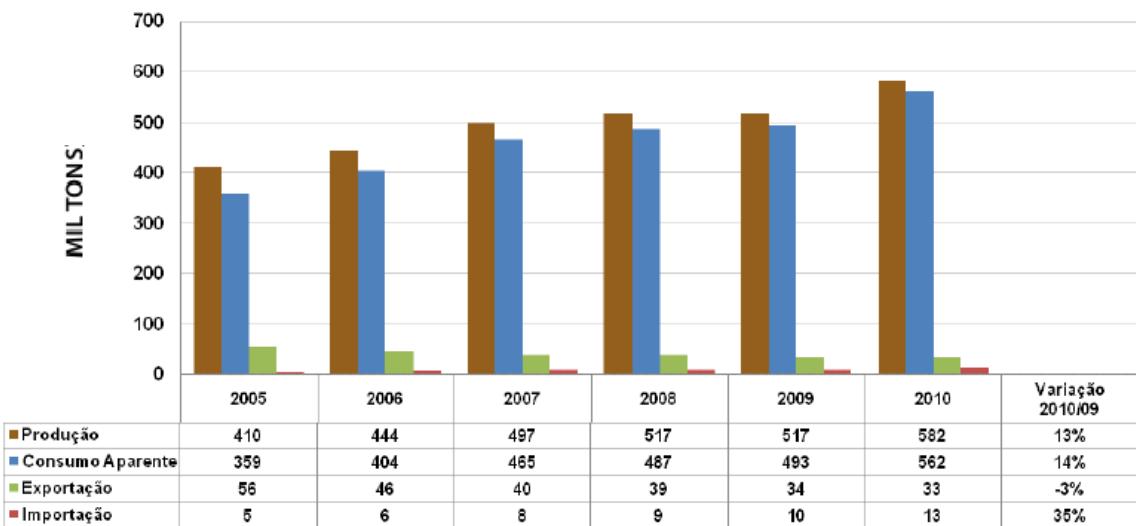


Figura 1.2: Produção, consumo aparente, exportação e importação sob todas as formas.

Fonte: ABICAB. Disponível em <<http://www.abicab.org.br/>>. Consulta em: nov/2011.

Entre as últimas novidades lançadas pelo mercado estão os chocolates contendo probióticos, que são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem saúde ao hospedeiro (MENG et al., 2008). A ação benéfica atribuída a esses micro-organismos está diretamente relacionada ao trato intestinal e os benefícios incluem proteção contra infecções, controle da síndrome do intestino irritado, normalização da flora intestinal microbiótica, alívio de sintomas alérgicos alimentícios na infância, aumento da tolerância à lactose e redução dos fatores de risco de câncer (MENG et al., 2008; SAAD, 2006; ARAGON-ALEGRO et al., 2007).

Diversos são os micro-organismos utilizados como probióticos com destaque para os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SAAD, 2006; GOMES e MALCATA, 1999). As bactérias do tipo lactobacilos são utilizadas na alimentação humana há mais de quatro décadas nas formas de iorgutes e bebidas lácteas e se destacam na produção de probióticos para uso animal e humano (GOMES e MALCATA, 1999).

No presente trabalho é feito o estudo da viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus* em formulações de chocolate. Um dos fatores que justificam este estudo é que nem todas formulações com organismos probióticos possuem a estabilidade necessária para garantir que o produto tenha ação benéfica esperada. Assim, estudos que avaliam a vida de prateleira e estabilidade do produto são de interesse comercial e são importantes no desenvolvimento de novos produtos. A importância deste trabalho também é ressaltada pela carência de estudos que descrevem probióticos em chocolate. Rivera-Espinoza e Gallardo-

Navarro (2010), em uma revisão que descreve os principais usos de probióticos em alimentos não-lácteos não apresentam nenhum produto que contém chocolate.

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em preparar formulações probióticas de chocolate com *Lactobacillus acidophilus* e avaliar o produto quanto à sobrevida das células durante a vida de prateleira do produto. E os objetivos específicos foram:

- i) Testar a viabilidade de uso de diferentes tipos de formulações, bombons com recheio e barras, como fonte de organismos probióticos;
- ii) Avaliar a influência do tipo de chocolate utilizado e da secagem das células pós-fermentação na cinética de morte celular;
- iii) Verificar o efeito de condições distintas de fermentação na estabilidade do produto gerado descrita em termos de sobrevida, distribuição densidade probabilidade e função risco;
- iv) Avaliar o produto gerado em termos de características físico-químicas e sensoriais.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Chocolate

2.1.1. História

A história do uso do cacau e do chocolate remonta desde eras pré-colombianas, porém o chocolate só foi batizado em meados do século XVIII. Carlos Linnaeus, um botânico sueco que conhecia muito bem a trajetória do chocolate por meio da história dos povos, o batizou como “Theobroma” que significa “alimento dos deuses”(BATISTA, 2008). Evidências apontam a origem do cacau na Amazônia, porém os primeiros usos foram feitos pelos povos Mesoamericanos (GRIVETTI e SHAPIRO, 2009). Os relatos mais antigos sobre plantio e uso do cacau e do chocolate datam de 600 a. C. quando os maias estabeleceram as primeiras plantações de cacau. Eles se referiam ao cacau como alimento dos deuses e foram os precursores a usar a bebida à base de cacau (KUBESH et al., 2008). Os astecas também cultivavam o cacau. Eles acreditavam que as sementes de cacau eram um presente do deus Quetzalcoatl. Conta a lenda asteca que Quetzalcoatl, deus da lua, roubou uma árvore de cacau da terra dos filhos do sol, para presentear seus amigos, os homens, com aquela delícia dos deuses (ABICAB). As colheitas eram festejadas com sacrifícios humanos nos quais eram oferecidas às vítimas taças com uma bebida amarga e apimentada chamada “tchocolath” (Figura 2.1), que significa bebida quente. Nestas duas civilizações, o chocolate era usado apenas pela nobreza e em rituais sagrados (KUBESH et al., 2008). Entre os incas, o cacau era produzido em quantidade suficiente para uso de toda população. Para estas civilizações, o uso do cacau ia além do valor nutritivo, pois as sementes do cacau também eram usadas como moeda (BATISTA, 2008).

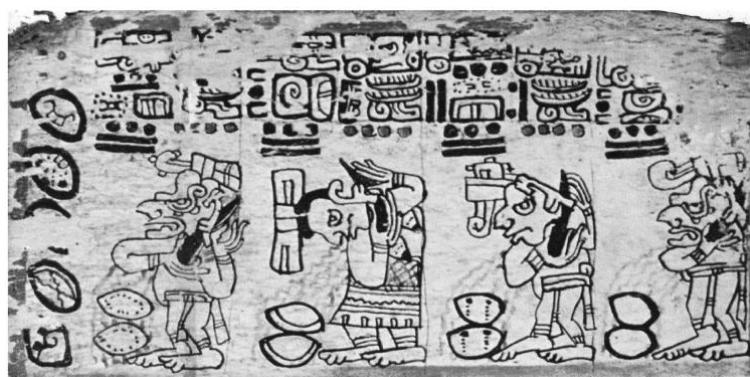


Figura 2.1: Cacau e incenso como oferendas do ritual de derramamento de sangue.

Fonte: GRIVETTI e SHAPIRO, 2009

Em 1502, Cristóvão Colombo chegou à ilha de Guajano, na América Central, na qual um chefe asteca lhe ofereceu, entre outras iguarias, sementes de cacau. Dezessete anos mais tarde, o explorador espanhol Hernando Cortez e seus soldados desembarcaram no México e foram recebidos com um grande banquete regado com taças de ouro cheias de “tchocolath” pelo imperador asteca Montezuma. Cortez, impressionado com a mística que envolvia o chocolate e seu uso corrente, estabeleceu uma plantação de cacau para o rei Carlos V, com o intuito de gerar riquezas. As sementes de cacau produzidas eram trocadas por ouro, uma vez que o ouro era um metal indiferente àqueles povos. O consumo de chocolate se espalhou entre a nobreza espanhola (Figura 2.2) e, para atenuar o sabor amargo, a porção de especiarias foi diminuída e usava-se mel para adoçá-lo (BATISTA, 2008). Os espanhóis não dividiram a nova bebida com o resto da Europa e por cerca de 100 anos apenas eles tiveram acesso ao chocolate (KUBESH et al., 2008; BECKETT, 2008).



Figura 2.2: Ritual da Corte Espanhola. “Um cavaleiro e uma dama tomando chocolate”.
Gravura de Nicolas Guérard (1648 – 1719). Paris, Biblioteca Nacional.

No século XVII, o italiano Antonio Carletti levou o segredo da preparação do chocolate da Espanha para a Itália e o casamento entre o rei Luís XIII, da França, com a infanta da Espanha, Ana da Áustria, selou a conquista do chocolate na França (BATISTA, 2008). O consumo cresceu e as casas de chocolate se espalharam pela Europa; o cacau, apesar de caro, era charmoso para quem pudesse comprá-lo (GRIVETTI e SHAPIRO, 2009).

A indústria do chocolate se iniciou no século XIX, por volta dos anos 20 com o surgimento de fábricas de chocolate comercial na Suécia, Inglaterra e Estados Unidos (GRIVETTI e SHAPIRO, 2009). Em 1847 foi criado o primeiro chocolate sólido comestível e em 1876 foi desenvolvido o primeiro chocolate ao leite (KUBESH et al., 2008). A revolução industrial contribuiu imensamente para a mudança da mentalidade em relação ao chocolate: mantendo o prestígio, porém, deixando-o acessível ao povo. O aumento do consumo do chocolate fez crescer também o número de países produtores de cacau. Com um clima

favorável ao cultivo da fruta, a Bahia se tornou grande produtora, firmando o Brasil como um dos maiores produtores de chocolate do mundo (BATISTA, 2008).

2.1.2. O Cacaueiro

O cacaueiro é uma planta da família *Sterculiaceae*, gênero *Theobroma*, sendo uma cultura típica de áreas tropicais e sub-tropicais (Figura 2.3), pois nestas regiões o solo é fértil e o equilíbrio climático é favorável ao cultivo do fruto, uma vez que a árvore exige temperaturas superiores a 20°C para se desenvolver adequadamente (ABICAB).

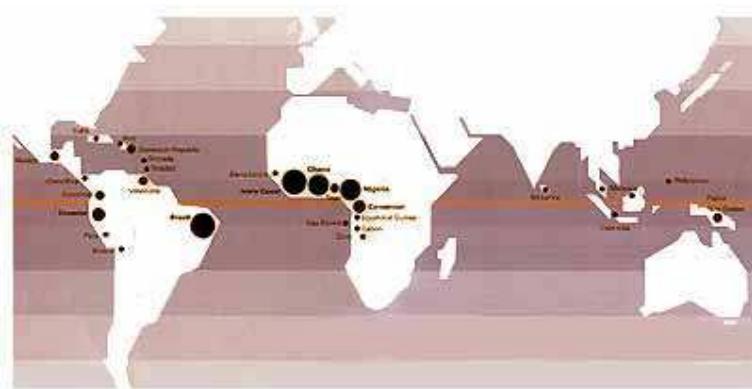


Figura 2.3: Principais produtores de cacau.

Fonte: ABICAB. Disponível em <<http://www.abicab.org.br/>>. Consulta em: jan/2011.

Também chamado de palmeira-cacau, o cacaueiro tem uma particularidade: dá ao mesmo tempo brotos, flores, folhas e frutos (ABICAB) (Figura 2.4). É uma árvore frágil, geralmente plantada perto de bananais, coqueiros e seringueiras com o intuito de proteger contra o vento e o sol excessivo. Os primeiros frutos são colhidos após o quinto ano de vida da planta (KUBESH et al., 2008; BATISTA, 2008). Os frutos demoram de 5 a 6 meses para se desenvolver até tornarem-se maduros com cerca de 100 mm até 350 mm, podendo pesar de 200 g até mais de 1 kg (BECKETT, 2008). Em seu interior encontra-se uma polpa branca, viscosa, contendo de 20 a 50 favas de cacau (Figura 2.5). Existem mais de 16 espécies de cacau (ABICAB).

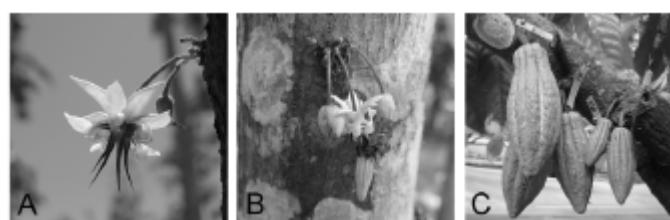


Figura 2.4: Desenvolvimento do cacaueiro: a) flor de cacau; b) fruto pequeno; c) fruto maduro
Fonte: GROENEVELD et al. (2010)

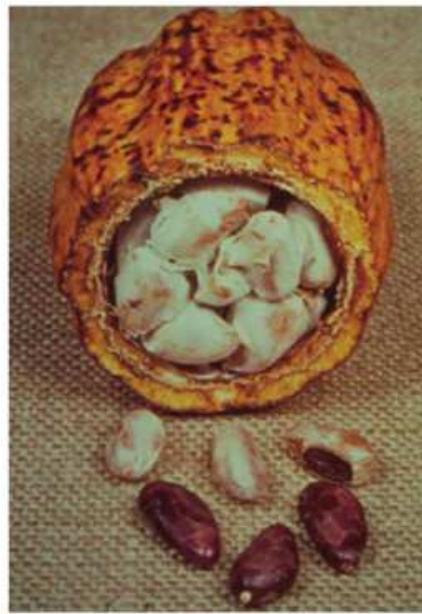


Figura 2.5: Fruto do cacaueiro.
Fonte: Beckett (2008).

2.1.3. Processamento do chocolate

O processo produtivo que gera como produto o chocolate, entre outros produtos é iniciado com o plantio do cacaueiro. Esta fase é chamada “antes da porteira” e visa a produção da amêndoa do cacau seca (MENDES e LIMA, 2007).

Para produção de uma amêndoia de boa qualidade é necessário que se colha exclusivamente frutos maduros, pois estes possuem a quantidade de açúcar necessária para uma boa fermentação. A maturação é reconhecida pela coloração do fruto e o ruído característico que o fruto maduro faz quando é levemente sacudido (Figura 2.6). Os frutos colhidos são quebrados com auxílio de um cutelo (facão sem corte) e a amêndoia extraída do interior do fruto é fermentada em cochos (caixas de madeira; Figura 2.7). A fermentação dura em torno de 5-6 dias e tem o intuito de destruir o embrião e dar início a série de reações químicas e enzimáticas que formam os precursores do sabor e aroma do chocolate. Findada a fermentação, faz-se a secagem para redução da umidade, que inicialmente encontra-se em 50%, para cerca de 8%, podendo ser este processo feito de forma natural ou artificial. Assim, com as amêndoas secas, é seguro estocá-las e armazená-las (BATISTA, 2008; BECKETT, 2008; SILVA NETO, 2001).



Figura 2.6: Frutos da cacau com diferentes maturações.

Fonte: MENDES e LIMA (2007).



Figura 2.7: Processo de fermentação das amêndoas de cacau e cochas.

Fonte: Beckett (2008).

Como mostra a Figura 2.8, a amêndoia de cacau seca, sem a casca e fragmentada em pequenos pedaços chamados nibs, é a principal matéria prima para fabricação do chocolate e outros produtos.

A fase seguinte é chamada “dentro da porteira”, e consiste na comercialização das amêndoas fermentadas secas. Na indústria, inicia-se a fase “depois da porteira”, que através de uma série de processos mostrados de forma simplificada na Figura 2.8 obtém-se, dentre outros produtos, o chocolate (MENDES e LIMA, 2007).

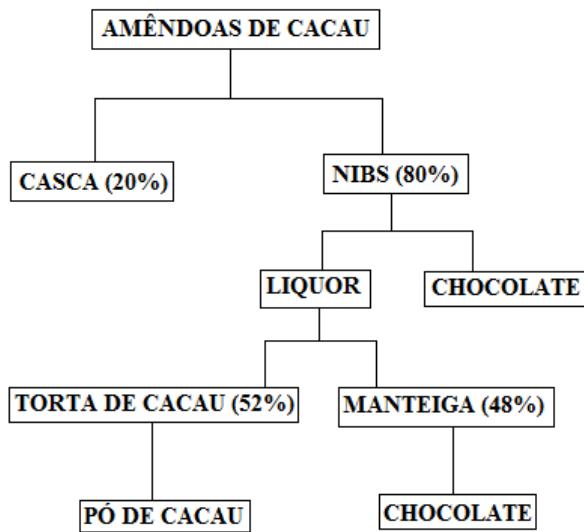


Figura 2.8: Geração de produtos a partir da amêndoas de cacau.

Fonte: MENDES e LIMA (2007).

Na indústria as amêndoas secas de cacau são recebidas, geralmente, em sacos de 60 kg. Parte das amêndoas é estocada e a outra parte é despejada na moega de alimentação para obtenção do liquor, onde segue pelo canal de alimentação através de peneiras que separam as amêndoas de quaisquer tipos de sujidades, incluindo pedras e metais. As amêndoas isentas de sujidades são transportadas para esterilização em autoclave contínua, de onde seguem para torrefação. Depois de torradas, as amêndoas são fracionadas em um “quebrador centrífugo de cacau”, e os fragmentos de cacau produzidos são chamados de nibs. Neste estágio os nibs de cacau torrados seguem para o separador de cascas, no qual são classificados por peneiras. Os nibs alimentam a moega de alimentação do moinho de pinos, onde são centrifugados e moídos, saindo no estado líquido por causa do alto teor de gordura (55%). Uma bomba transporta a massa de cacau para um tanque de estocagem. A massa de cacau estocada é bombeada para a temperadeira de massa de cacau de múltiplos estágios, onde será submetida ao processo de pré-cristalização por resfriamento, seguindo daí para o sistema de dosagem do tipo Kibllet (pedaços de massa quebrados) sendo depositada diretamente sobre a correia transportadora do túnel de resfriamento onde será submetida a uma temperatura de 4 a 6 °C durante 20 minutos, até que sua solidificação se complete, sendo fracionado por um sistema de rolo na saída do túnel e depositado na moega da ensacadeira. Os kibllet são transportados da moega de ensaque através de uma rosca transportadora dosadora para o interior dos sacos multifolhados com capacidade de 25 kg cada, sendo estes costurados para seu fechamento final. Depois de obtido o liquor, este é

submetido a prensagem hidráulicas, no qual se extrai boa parte da manteiga de cacau presente na massa. A manteiga obtida é filtrada, centrifugada e desodorizada. A torta restante da prensagem para extração da manteiga passa por moinhos que a pulverizam e produzem o cacau em pó (MENDES e LIMA, 2007). A obtenção de tipos de chocolate refinados e especiais depende da mistura do liquor, da manteiga de cacau, do açúcar e do leite em determinadas proporções (AMIN, 2009). A Figura 2.9 apresenta um diagrama esquemático do processo produtivo de chocolate.

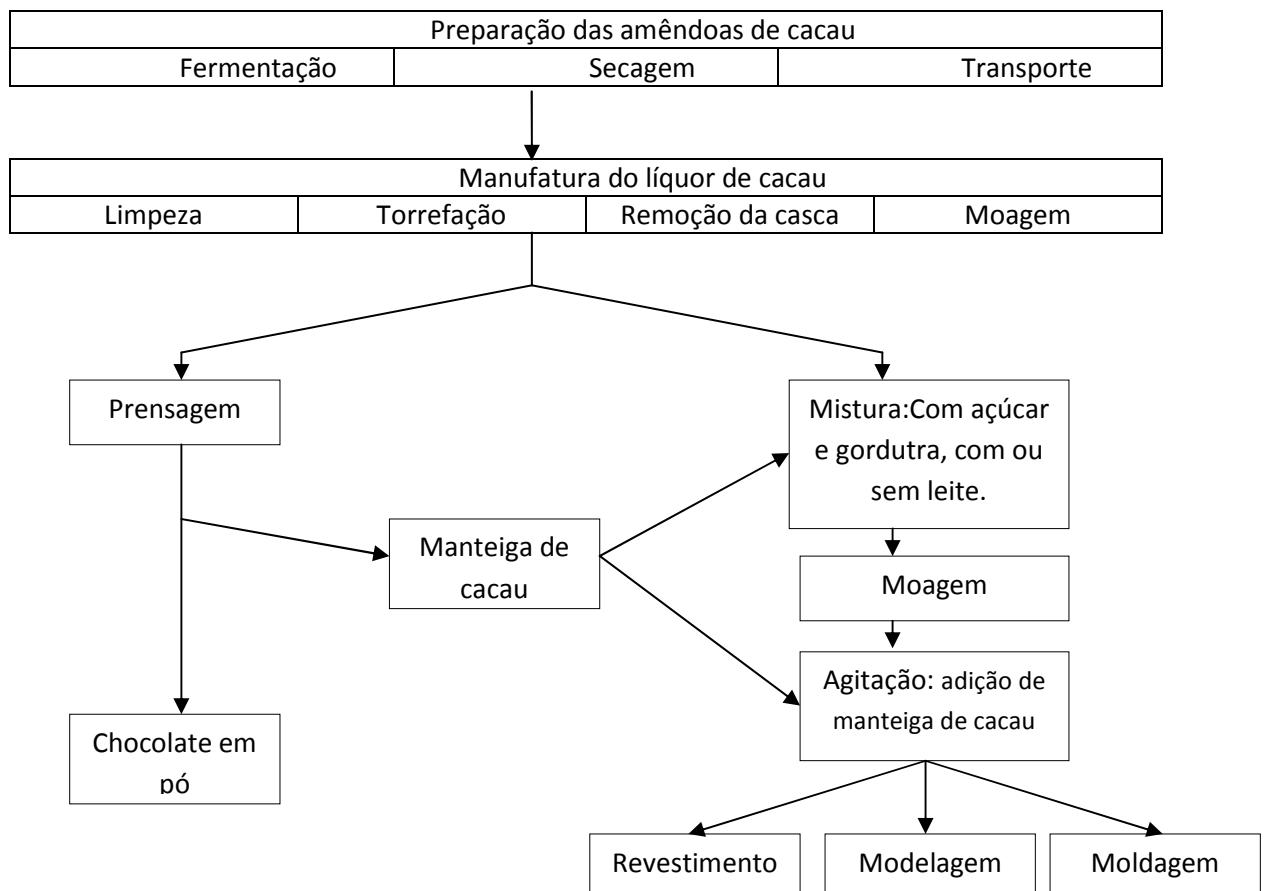


Figura 2.9: Diagrama esquemático do processo produtivo de chocolate.
Fonte: Beckett (2008).

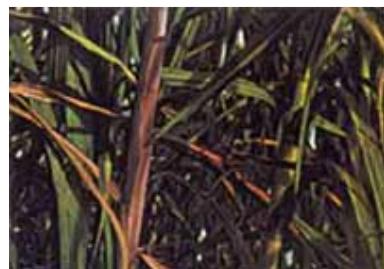
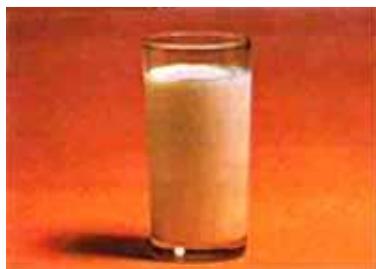
A Tabela 2.1 apresenta de forma resumida todas as etapas do processamento do cacau até a obtenção do chocolate.

Tabela 2.1 - Processo de produção do chocolate

Fase	Descrição	
Antes da porteira	Plantio	Realizado em regiões tropicais, pois o cacaueiro precisa de temperaturas superiores a 20 °C para se desenvolver adequadamente
	Colheita dos frutos maduros e retirada das amêndoas	Somente os frutos maduros possuem o teor de açúcar correto para uma boa fermentação. A maturação é reconhecida pela coloração e ruído característico que o fruto faz quando é agitado. O fruto é quebrado com auxílio de um cutelo e as amêndoas são retiradas.
	fermentação das amêndoas	Geralmente feita em cochos de madeira, este processo visa a destruição do embrião na semente e geração dos precursores do aroma e sabor do chocolate
	secagem	Realizada natural ou artificialmente, visando a redução da umidade para cerca de 8% para correto armazenamento e transporte do grão.
Dentro da porteira	Comercialização das amêndoas fermentadas secas	Nesta etapa a amêndoa deixa o processo produtivo agrícola e adentra para o processo produtivo industrial
Depois da porteira	Limpeza	Separa as amêndoas secas de quaisquer tipo de sujidade, incluindo pedras e metais, e as esteriliza. Este processo também classifica as amendoas através de um conjunto de peneiras.
	Torrefação	As amêndoas são torradas e quebradas em pequenos fragmentos denominados nibs.
	Remoção da casca	Os nibs passam por um sistema de separação de casca provido de ciclones e são classificados por tamanho.
	Moagem	Os nibs passam por um moinho de pinos, onde são moídos saindo em fase líquida devido a alta concentração de gordura. O líquido é pré-cristalizado e seguem para a prensa.
	Prensagem	A prensa separa a manteiga de cacau da torta. A torta é pulverizada para produção de chocolate em pó. A manteiga de cacau é tratada e pode ser comercializada ou encaminhada para a produção do chocolate em barras.
	Mistura	O liquor, a manteiga de cacau, o açúcar e o leite são misturados em determinadas proporções para obtenção dos vários tipos de chocolate.
	Modelagem	Modelagem de acordo com a utilização: barra, bombons e doces diversos.

2.1.4. A química do chocolate

A ABICAB anunciou em seu site que o chocolate é um alimento perfeito, com composição balanceada (Figura 2.10), sendo indicado para merendas escolares e grandes coletividades. A justificativa para tal afirmação vem do fato do chocolate ser um alimento que é distribuído em variadas formas, sendo aceito por todo o mundo. Além do sabor, o chocolate é um alimento nutritivo e bastante energético, de fácil digestão e rápida metabolização. Sua composição é dependente do tipo de chocolate e do processo de fabricação. A Tabela 2.2, mostra a composição média do chocolate ao leite. A Tabela 2.3 mostra comparação entre a composição média de 3 diferentes tipos de chocolate: amargo, ao leite e branco.



1/3 de leite

Alimento rico em açúcares, proteínas, albuminas, globulinhas, caseína, sais minerais e vitaminas.

1/3 de açúcar

São os carboidratos, importantes para o organismo humano.

1/3 de cacau

O cacau é importante pelo teor de hidrato de carbono, manteiga (gordura natural), proteínas, cafeína e teobromina.

Figura 2.10: Composição média do chocolate ao leite, balanceamento entre os seus componentes.

Fonte: ABICAB. Disponível em <<http://www.abicab.org.br/>>. Consulta em: jan/2011.

Tabela 2.2: Composição nutricional do chocolate ao leite.

Um tablete de 100 g de chocolate ao leite, contém:

Glucídios	56 g
Lipídios	34 g
Protídios	6 g
Celulose	0,5 g
Água	1,1 g
Calorias	550 kcal
Elementos minerais	
Potássio	418 mg
Magnésio	58 mg
Cálcio	216 mg
Ferro	4 mg
Vitaminas	
Vitamina B1	0,10 mg
Vitamina B2	0,38 mg
Vitamina PP	0,80 mg

Fonte: ABICAB. Disponível em <<http://www.abicab.org.br/>>. Consulta em: jan/2011.

Tabela 2.3: Comparação entre os principais nutrientes dos chocolates amargo, ao leite e branco.

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

Fonte: BECKETT (2008).

A Figura 2.11 mostra que os chocolates são ricos em antioxidantes chamados de flavonóides (53,5mg/100g de chocolate amargo) que são compostos pertencentes ao grupo dos polifenóis. A quantidade de flavonóides nos produtos de cacau e no chocolate industrializado é dependente da colheita de grãos e condições de processo subsequentes usado pelos fabricantes de chocolate (FERRAZZANO et al., 2009). Os flavonóides do chocolate são facilmente destruídos pelo calor e inúmeras outras condições comuns ao processo de colheita do cacau e de fabricação do chocolate e, assim, um grande cuidado deve ser tomado pelo fabricante para preservar a existência natural de flavonóides para que quantias significativas permaneçam nos produtos finais (RICHTER e LANNES, 2007). Os benefícios para a saúde atribuídos aos polifenóis incluem o seu efeito antioxidant, anticancerígeno, anti-inflamatório e preventivo de doenças do coração (SHIINA, 2007)

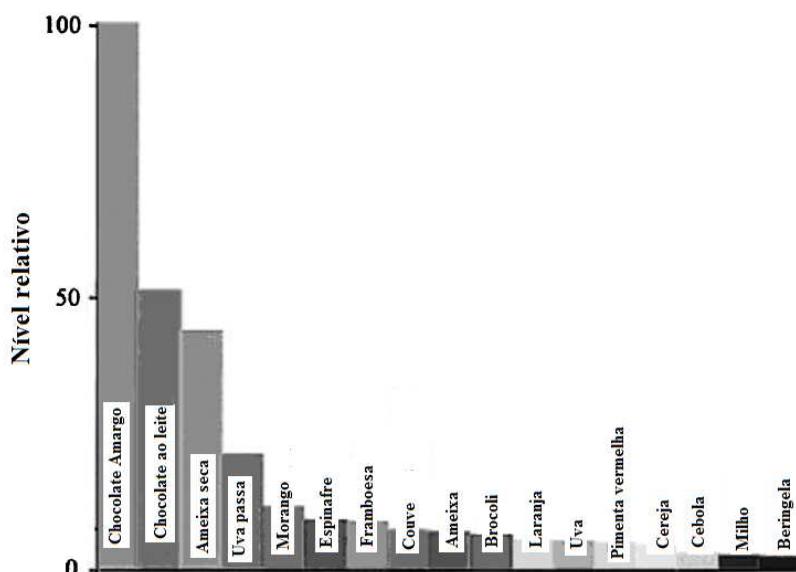


Figura 2.11: Potencial antioxidante do chocolate e alguns outros alimentos.

Fonte: BECKETT (2008)

Existem estudos que avaliam componentes do chocolate que podem reduzir os riscos de problemas dentários, como cáries (FERRAZZANO et al., 2009; BECKETT, 2008). Dentre estes compostos podem ser citados os taninos que são compostos que contribuem com a cor e sabor do chocolate. Acredita-se que os taninos tem efeito anti-bacteriano e reduz a atividade enzimática, reduzindo o crescimento de placa e inibindo a formação de ácido que provoca a cárie. A manteiga de cacau é usada pela indústria de cosméticos com o intuito de minimizar linhas de expressão (FERRAZZANO et al., 2009).

O chocolate pode influir no estado fisiológico, através de uma série de componentes, como por exemplo a cafeína e a teobromina que são estimulantes do sistema nervoso central (BECKETT, 2008). As quantidades de cafeína e teobromina para alguns alimentos são

mostradas na Tabela 2.4. O chocolate possui também feniletilamina (PEA), um estimulante muito parecido com a dopamina e a epinefrina, que são produzidos naturalmente pelo organismo (RICHTER e LANNES, 2007). Macht e Dettmer (2006) concluem que a ingestão de chocolate pode estimular alterações emocionais tanto positivas quanto negativas, além de reduzir o cansaço e aumentar a sensação de alegria, porém, Osman e Sobal (2006) mostram em seu estudo que as quantidades de teobromina, cafeína, feniletilamina e anandamida estão presentes em quantidade insuficiente para produzir efeito mensurável sobre o humor ou comportamento.

Tabela 2.4: Metilxantina: conteúdo de chocolates e bebidas.

	Porção	Cafeína (mg)	Teobromina (mg)
Chocolate ao leite	50 g	10,0	70
Chocolate amargo	50 g	22,0	209
Chocolate branco	50 g	Traços	1,1
Café forte	Xícara	85,0	-
Café instantâneo	Xícara	60,0	-
Chá	Xícara	50,0	2,0
Cola	Lata	40,0	-

Fonte: BECKETT (2008).

2.1.5. Novidades do mercado mundial

A empresa suíça *Barry Callebaut* inovou o mercado de chocolates com uma nova linha de produtos destinada a consumidores preocupados com a saúde, como mostrado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Linha de produtos “bem-estar”, apresentados pela Barry Callebaut.

Produtos	Descrição
<i>Acticoa chocolates</i>	Resultado de um processo especial que mantém níveis muito elevados de ocorrência natural de flavonóides (antioxidantes).
<i>Probiotic chocolates</i>	São três tipos de chocolate que contêm uma combinação de <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> . Contêm quantidade suficiente destes dois tipos de probióticos para ajudar a manter o sistema digestivo saudável.
<i>Re-balanced chocolates</i>	Melhor perfil nutricional, sem comprometer o sabor: rico em fibras, reduzido teor de açúcar, menos calorias e baixo teor de gordura.
<i>Tooth-friendly chocolate</i>	Adoçado com isomaltulose, uma nova geração de açúcares que são seguros para os dentes.

Fonte: Barry Callebaut. Disponível em <http://www.barry-callebaut.com/1468>

2.2. Alimentos funcionais

Os primeiros estudos a relacionar alimentação e saúde datam da década de 1960.

Tais estudos apontavam aspectos negativos para o consumo de excesso de açúcar e gordura (RAUD, 2008). A crescente preocupação em se ingerir alimentos saudáveis, que favoreçam o bem estar e auxiliem na redução de doenças, fez crescer a demanda por alimentos mais saudáveis (CORRÊA, 2006). Existem evidências científicas que suportam a hipótese de que alguns alimentos e componentes alimentares têm efeitos fisiológicos benéficos além da provisão nutricional básica. A ciência nutricional está abandonando os conceitos clássicos nutricionais que definiam o que é a “boa” ou “ótima” nutrição e as pesquisas estão focando na identificação de componentes biológicos ativos em alimentos que têm o potencial de otimizar o bem estar físico e mental e que reduzam também o risco de doenças (KEDIA et al., 2007).

Em 1907, o cientista russo Elie Mechnikoff (Figura 2.12) chamou a atenção para a importância da microbiota intestinal na saúde humana. Ela exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do nosso organismo e a qualidade da flora intestinal pode ser controlada através de uma alimentação equilibrada e específica. O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de alimentos funcionais que objetivam a manutenção e estímulo das bactérias ali presentes. Desta forma, alimentos funcionais são definidos como “alimentos que demonstraram afetar benicamente uma ou mais funções-alvo no organismo, além de promoverem a nutrição, de modo relevante para um aumento do estado de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doenças”. Alguns desses alimentos são classificados em prebióticos, probióticos e simbióticos (CORRÊA, 2006).

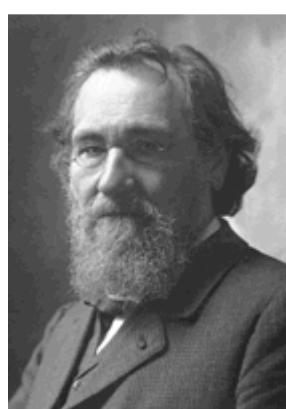


Figura 2.12: Fotografia de Elie Mechnikoff (1845-1916).
Fonte: Wikipédia

Os prebióticos podem ser definidos como ingredientes alimentícios não digestíveis que afetam o corpo humano de forma benéfica, através do estímulo seletivo e/ou ativação de grupos de bactérias do cólon. Os probióticos são micro-organismos que são benéficos ao

hospedeiro quando administrados em quantidades apropriadas. O termo simbiótico é usado quando o produto possui agentes tanto prebióticos quanto probióticos (ARAGON-ALEGRO et al., 2007).

2.2.1. Os probióticos

O termo probiótico foi usado pela primeira vez em 1965 para designar micro-organismos que exercem efeitos benéficos para a saúde ao melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (RAUD, 2008). A definição atual, aceita internacionalmente, diz que os probióticos são “micro-organismos vivos não patogênicos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (CORRÊA, 2006; MENG et al., 2007). A quantidade mínima necessária para que o alimento forneça benefícios é de no mínimo um milhão (10^6 cel/g) de organismos probióticos por grama de alimento (CAPELA et al., 2007). Como recomendação geral, é sugerido que os produtos com probióticos contenham no mínimo 10^7 ufc/g(ml) (CHAN e ZHANG, 2005). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que a quantidade mínima viável deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 ufc/ingestão, na recomendação diária do produto pronto para consumo, sendo que, valores menores podem ser aceitos se a empresa comprovar sua eficácia mediante documentação comprobatória que inclua laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável de micro-organismos até final do prazo de validade e teste de resistência da cultura da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares.

Dentre os benefícios dos probióticos em relação à saúde do hospedeiro podem-se citar: resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse açúcar; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais; produção de vitaminas, redução dos sintomas de diarréia (CHAN e ZHANG, 2005). Outros benefícios ainda não comprovados incluem: diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular; diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol; efeitos anti-hipertensivos; redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*; controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*; prevenção de infecções urogenitais, e efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (CORRÊA, 2006).

Um micro-organismo para ser dito probiótico deve ter certas propriedades e funções, como, sobreviver às condições adversas do estômago, ser resistente aos sais biliares e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal

onde deverão influenciar o metabolismo e o equilíbrio da microbiota intestinal (ARAGON-ALEGRO et al., 2007). A Tabela 2.6, apresenta as espécies de micro-organismos consideradas probióticas no Brasil.

Tabela 2.6: Agentes probióticos definidos pela ANVISA

Agentes Probióticos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei shirota</i>
<i>Lactobacillus casei variedade rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei variedade defensis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i>)
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: ANVISA: Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho/2008

As espécies que possuem as propriedades benéficas e resistem as condições acima, geralmente são do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Figuras 2.13 e 2.14) (ARAGON-ALEGRO et al., 2007). A Tabela 2.7 faz um paralelo entre os benefícios associados às espécies.

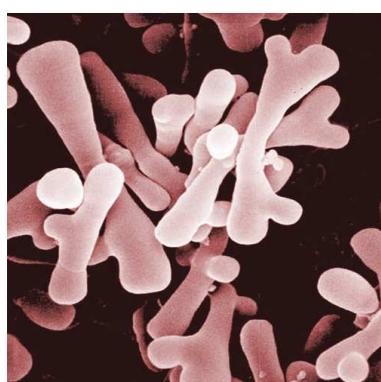


Figura 2.13: *Bifidobacterium*
Fonte: www.microbiologybytes.com



Figura 2.14: *Lactobacillus*
Fonte: <http://blog.therabreath.com>

As espécies de *Lactobacillus* são largamente distribuídas na natureza e algumas delas são conhecidas pela importância na indústria alimentícia e, como agentes probióticos, agem de forma benéfica em seres humanos e animais (MAGALHÃES et al., 2008). O maior foco de mercado é a adição deste micro-organismo em derivados de leite fermentados, sendo que a escolha depende de uma série de fatores. No iogurte, por exemplo, a escolha depende do pH, do tempo de fermentação, das condições de armazenamento, da concentração de açúcar, da

disponibilidade de nutrientes, entre outras (VINDEROLA et al., 2000). A Figura 2.15 mostra alguns exemplos de aplicação de diferentes espécies de *Lactobacillus* na indústria alimentícia.

Tabela 2.7: Benefícios gerais atribuídos às *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*

Benefícios

- Evitar a colonização do intestino por bactérias patogênicas e leveduras;
- Produzir ácidos que mantêm o equilíbrio do pH no intestino;
- Diminuir os efeitos colaterais da terapia antibiótica;
- Ajudar no crescimento bactérias primária em lactentes;
- Inibir o crescimento de bactérias que produzem nitratos no intestino. Os nitratos são tóxicos e podem causar câncer;
- Ajudar a impedir a produção e absorção de toxinas produzidas por bactérias causadoras de doenças, o que reduz a carga tóxica sobre o fígado;
- Auxiliar na fabricação de vitaminas do complexo B;
- Ajudar na regulação do peristaltismo e dos movimentos intestinais;
- Prevenir e tratar a diarréia associada a antibióticos.

Fonte: : LIPSKI (2004).



Figura 2.15: Aplicação de probióticos na indústria alimentícia.

A espécie *Lactobacillus acidophilus* é citada desde 1921 por seus benefícios à regulação de desordens do trato digestório através da administração de leites fermentados contendo números elevados de *L. acidophilus* de origem humana. Este micro-organismo é pouco tolerante à salinidade e tem seu desenvolvimento favorecido em meios sólidos. Entre os micro-organismos do gênero *Lactobacillus* o *L. acidophilus* é o mais recomendado como suprimento dietético, por possuir alta capacidade de adesão ao epitélio intestinal, onde desempenha importante papel na melhoria da digestibilidade de produtos lácteos, além de diminuir os níveis de colesterol no intestino por sua co-precipitação com sais biliares e controle preventivo de infecções intestinais (GONÇALVES, 2009).

Dentre as diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*, o LA-5 é citado na produção de fermentados de leite por todo o mundo. Seu uso crescente deve-se ao fato de não possuir efeitos adversos no gosto, aparência e palatabilidade dos produtos, além do fato de ser capaz

de sobreviver no produto até o consumo. O LA-5 é capaz de sobreviver a passagem pelo estômago, sendo tolerante a acidez do estômago, à bile e as enzimas digestivas. Os efeitos gastrointestinais e imunológicos diretamente associados ao consumo de *Lactobacillus acidofilus* LA-5 escontram-se relacionados na Tabela 2.8 (LEE e SALMINEN; 2009).

Tabela 2.8: Benefícios gastrointestinais e imunológicos associados ao consumo de *Lactobacillus acidofilus* LA-5

Problema	Benefícios
Balanceamento da microbiota intestinal	Os produtos finais da decomposição de glicose por fermentação através de <i>Lactobacilli</i> são ácido lático, ácido acético e peróxido de hidrogênio. Tais metabólicos tornam o ambiente menos favorável ao crescimento de micro-organismos potencialmente patogênicos. Controla o pH intestinal através da produção de ácidos, restringindo o crescimento de bactérias de patogênicas e de putrefação.
Redução da diarréia	A diarréia é um problema comum entre viajantes em regiões pobres em higiene. Estudos mostraram o decréscimo da ocorrência de diarréia no grupo testado quando comparado ao grupo placebo
Outros efeitos gastrointestinais	Constipação é um problema comum em países desenvolvidos e a suplementação com <i>Lactobacillus</i> pode ajudar no tempo de transito normal. Melhora na digestão de lactose
Outros benefícios à saúde	Inibição do crescimento de células cancerígenas Redução do colesterol

Fonte: LEE e SALMINEN (2009).

2.2.2. Estabilidade

A estabilidade de formulações com probióticos em sua composição está relacionada a características físico-químicas do produto (item 2.3) e a taxa de degradação natural do mesmo e das células. A degradação do produto pode ser devida a reações de oxi-redução, reações com o meio ambiente, contaminações no preparo ou estocagem, ou degradação natural por envelhecimento, como é mostrado na Figura 2.16 e explicado na Tabela 2.9. A degradação (morte) das células pode ser resultado da interação das células com o suporte (por exemplo, meio inapropriado para manutenção celular) ou por envelhecimento das mesmas.

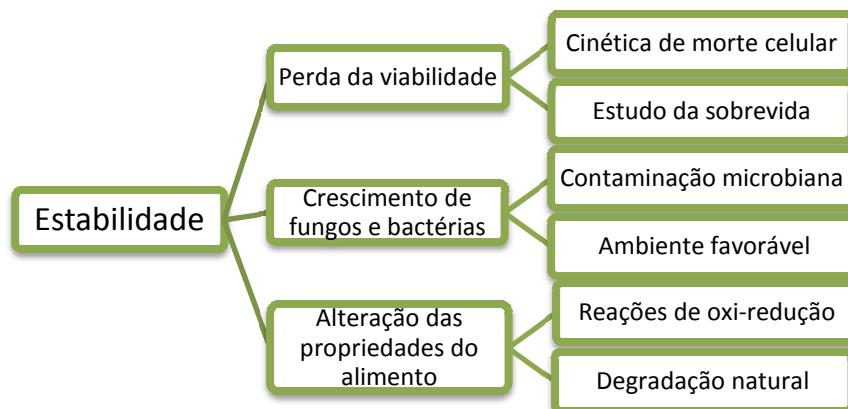


Figura 2.16: Descrição da estabilidade do produto

Tabela 2.9: Variáveis que afetam a estabilidade

Variável	Descrição
Contaminação microbiana	Podem ocorrer em qualquer fase do processamento de alimentos e devem ser evitadas pela adoção de métodos de higienização e boas práticas de fabricação, controle de pragas e através da criação de condições ambientais desfavoráveis para o crescimento de micro-organismos contaminantes.
Ambiente	Agentes como o ar, luz, calor e frio podem ocasionar alterações organolépticas ou mesmo na aparência dos alimentos que os tornam inaceitáveis para o consumo.
Reações de oxi-redução	Entre as reações químicas não enzimáticas pode-se citar a reação de rancificação. Essa reação é acelerada pelo oxigênio, luz, temperatura, metais e presença de oxidantes naturais.
Degradação natural	As moléculas que constituem os alimentos têm energia de ativação que favorece a sua degradação natural

Fonte: Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações (Gava et al., 2008)

O estudo de estabilidade celular pode ser feito através de funções estatísticas que definem o comportamento celular ao longo do tempo. Entre estas funções estão a função sobrevida, função densidade probabilidade e função risco vêm sendo utilizadas com este propósito (LEE e WANG, 2003).

A função sobrevida descreve a probabilidade de um indivíduo sobreviver mais que um tempo t como mostrado nas Equações (2.1) e (2.2) que descrevem a mesma em termos do conceito probabilístico (P) e em termos da quantificação celular ($N(t)$, N_0) (LEE e WANG, 2003).

$$S(t) = P(t) \quad (2.1)$$

$$S(t) = \frac{\text{número de células sobrevivente em tempo superior a } t}{\text{número total de células iniciais (}t=0\text{)}} = \frac{N(t)}{N_0} \quad (2.2)$$

Sendo $N(t)$ o número de células sobreviventes em um tempo superior a t , N_0 o total número de células no tempo $t = 0$, $S(t)$ a função sobrevida no tempo t , $P(t)$ é a probabilidade de um micro-organismo sobreviver mais que um tempo t .

Trata-se de uma função decrescente que tende a zero para tempos infinitos e apresenta valor unitário no início do estudo como mostrado na Figura 2.17 que trata da representação gráfica da mesma para análise não paramétrica.

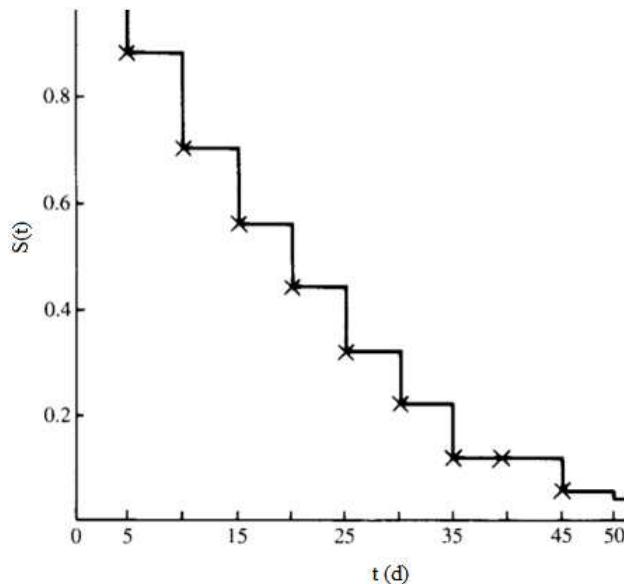


Figura 2.17: Representação gráfica da função sobrevida

Fonte: LEE e WANG (2003).

A função densidade probabilidade indica o limite da probabilidade de falha (morte celular) por unidade de tempo (Equação 2.3), trata-se de uma função não negativa cuja área entre o eixo do tempo e a curva tem valor unitário. A integração desta função é associada a probabilidades de falha e a própria sobrevida (LEE e WANG, 2003).

$$f(t) = \frac{\lim_{\Delta t \rightarrow 0} P[\text{morte individual no intervalo } (t, t + \Delta t)]}{\Delta t} \quad (2.3)$$

A Figura 2.18 mostra o gráfico representativo desta função que é conhecido como curva de densidade. Esta curva apresenta dois comportamentos típicos: as curvas com formato decrescente mostram uma elevada taxa de inssucesso no início do processo, indicando a morte prematura das células e as curvas com formato de “sino” mostram a maior morte celular ao longo do tempo de envelhecimento do produto (LEE e WANG, 2003).

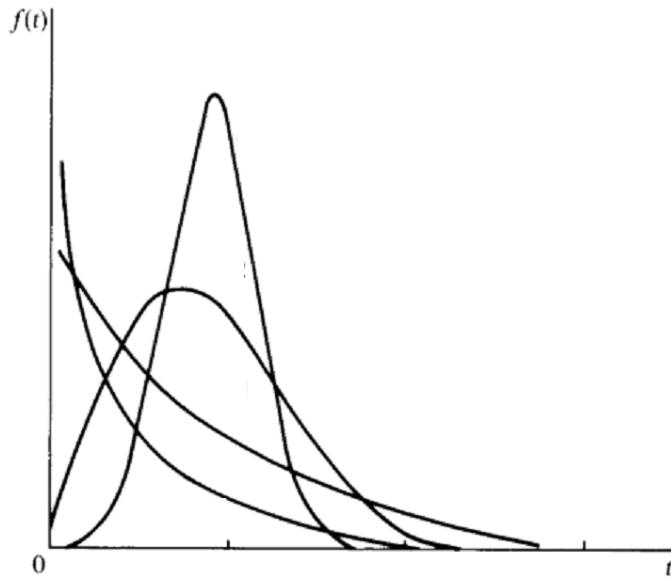


Figura 2.18: Representação gráfica da função densidade probabilidade

Fonte: LEE e WANG (2003).

A função risco define a velocidade ou taxa de falha condicional associada a um tempo (Equação 2.4). Ela fornece o tempo em que se observa a maior chance de morte celular por unidade de tempo durante o processo de envelhecimento. Esta função pode apresentar comportamento variável conforme mostrado na Figura 2.19. O comportamento crescente ($h_1(t)$) significa que o risco de morte aumenta a medida que o produto envelhece, o comportamento decrescente ($h_2(t)$) mostra que o risco de morte é maior durante a fase de preparo ou vida inicial do produto, o comportamento constante ($h_3(t)$) indica que o produto apresenta o mesmo risco de morrer em qualquer etapa do processo, seja no preparo, seja ao longo do tempo de armazenamento. A curva $h_4(t)$ mostra a curva em formato de “banheira” na qual há uma maior chance de morte no tempo de vida inicial do produto, seguido de um descréscimo deste risco ao longo do tempo de armazenamento até se aproximar de um risco constante que volta a aumentar no final da vida do produto. Por fim, a curva $h_5(t)$, mostra um aumento no risco de morte no início da vida do produto, atingindo um ponto máximo, no qual este risco começa a cair (LEE e WANG, 2003).

$$h(t) = \frac{\lim_{\Delta t \rightarrow 0} P[\text{falha individual no intervalo de tempo } (t, t + \Delta t)]}{\Delta t} = -\frac{d}{dt} [\log(S(t))] \quad (2.4)$$

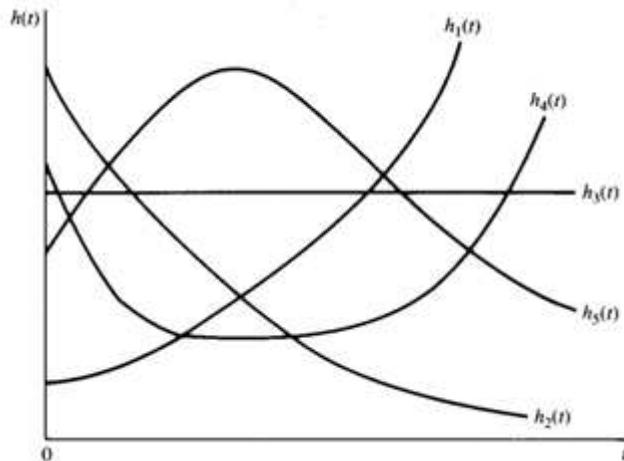


Figura 2.19: Representação gráfica da função risco

Fonte: LEE e WANG (2003).

A descrição das funções sobrevida, densidade de probabilidade e risco ($S(t)$, $f(t)$ e $h(t)$, respectivamente) é feita para diferentes modelos de distribuição de frequência. Um destes modelos é o modelo de distribuição Weibull que é bastante utilizado na descrição da vida útil de dispositivos eletrônicos, peças, equipamentos e micro-organismos. Este modelo é caracterizado por dois parâmetros, γ e λ . O parâmetro γ determina a forma da curva de distribuição e o valor λ determina sua escala. Quando γ é 1, a taxa de risco é constante ao longo do tempo, quando $\gamma < 1$ ocorre morte prematura. Valores de $\gamma > 1$ representam uma morte associada ao desgaste natural sendo que valores entre 3 e 4 tornam o modelo de Weibull próximo à distribuição normal. A taxa de risco aumenta quando $\gamma > 1$ e diminui quando $\gamma < 1$ ao longo do tempo e, dessa forma, a distribuição de Weibull pode ser usada para modelar a distribuição de sobrevivência de uma população que apresenta taxa de risco crescente, decrescente ou constante. A Tabela 2.10 apresenta as equações deste modelo (LEE e WANG, 2003).

Tabela 2.10. Equações da distribuição de Weibull

Função	Equação	
Função densidade probabilidade	$f(t) = \frac{\gamma}{\lambda} \left(\frac{t}{\lambda}\right)^{\gamma-1} e^{-(\frac{t}{\lambda})^\gamma}, t \geq 0; \gamma, \lambda > 0$	(2.5)
Função de distribuição cumulativa	$F(t) = 1 - e^{-(\frac{t}{\lambda})^\gamma}$	(2.6)
Função sobrevida	$S(t) = e^{-(\frac{t}{\lambda})^\gamma}$	(2.7)
Função risco	$h(t) = \frac{\gamma}{\lambda} \left(\frac{t}{\lambda}\right)^{\gamma-1}$	(2.8)

Fonte: LEE e WANG (2003).

Uma forma alternativa ao uso dos modelos paramétricos corresponde ao uso dos modelos não paramétricos como os modelos de Kaplan-Meier. Os modelos não paramétricos , também chamados modelos livres de distribuição, são menos eficientes quando os tempos de sobrevivência seguem uma distribuição teórica e são mais indicados quando esta distribuição é desconhecida ou quando os dados experimentais não se ajustam de forma esperada a estas distribuições. Os modelos não paramétricos são também úteis como etapa gráfica de avaliação destinada a escolha do modelo de distribuição, ou seja, pela forma gráfica das distribuições indicadas pela análise não paramétrica é possível simplificar quais distribuições devem ser testadas no ajuste.

2.3. Determinação das características físico-químicas do chocolate

Entre os principais constituintes do chocolate que influem nas propriedades e estabilidade do mesmo estão os lipídeos, os carboidratos e a água. Além da influência nas características sensoriais, que são discutidas no item 2.4, estes fatores influem de forma complexa nas características físico-químicas. Lipídeos, por exemplo, afetam o ponto de fusão do chocolate, o valor energético e a vida útil por conta de reações de rancificação e oxidação (SOUZA, 2010).

Pela importância e influência destes constituintes nas propriedades dos chocolates os mesmos são determinados e a análise da composição constitui uma informação importante que consta no rótulo dos chocolates e ajuda a compreender as características dos diferentes tipos de chocolate.

Os lipídios são compostos orgânicos constituídos principalmente de triacilgliceróis de ácidos graxos que atuam no transporte das vitaminas lipossolúveis, fornecem ácidos graxos e têm alto valor energético (cada grama de lipídeo fornece 9 kcal). A determinação de lipídios em alimentos é feita, na maioria dos casos, pela extração com solventes, sendo que o

procedimento mais simples é fazer uma extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente, mas em quantidades relativamente pequenas, que não chegam a representar uma diferença significativa na determinação. Em produtos à base de chocolate com alto teor de sacarose, o Instituto Adolfo Lutz (2008) recomenda que seja utilizado o método de determinação de lipídeos com hidrólise prévia. O princípio do método baseia-se na hidrólise prévia da amostra, extração e quantificação do resíduo obtido após a remoção do solvente.

A avaliação do teor de água é importante para prever a estabilidade e a segurança dos alimentos com relação ao crescimento microbiano, as taxas de reações químicas deterioradores e propriedades físicas (FONTANA, 1998). Na determinação da influência da água na estabilidade e outras características citadas não é o teor da mesma que influi e sim a forma na qual a água se encontra, sendo que esta forma é avaliada pela atividade de água. A atividade de água expressa a disponibilidade de água no alimento e é definida como a relação entre a pressão de vapor de água em equilíbrio em um alimento e à pressão de vapor de saturação de água na mesma temperatura (Equação 2.9). De maneira geral, quanto maior o teor de água, maior é a atividade de água e maior a sensibilidade à deterioração (ARAÚJO et al., 2009). A medida da disponibilidade de água varia entre 0 (água totalmente ligada) e 1 (água totalmente livre). O chocolate é um alimento microbiologicamente estável, pois apresenta atividade de água inferior a 0,6 (GAVA, 2008).

$$a_w = \frac{P_v}{P_v^{sat}} \quad (2.9)$$

Na qual, a_w é a atividade de água, P_v é a pressão de vapor de água em equilíbrio com o alimento e P_v^{sat} é a pressão de vapor de água em equilíbrio com água pura (pressão de saturação).

2.4. Análise sensorial de chocolate

A avaliação das características relacionadas ao sabor, odor e aspectos e outras propriedades sensitivas proporcionadas pelo chocolate são determinadas pela análise sensorial do mesmo. Este tipo de análise tem suas bases científicas estabelecidas durante a 2ª Guerra Mundial nos Estados Unidos. Diante da necessidade de estabelecer os motivos pelos quais as tropas rejeitavam um grande volume de ração, embora estivessem perfeitamente balanceadas, foram desenvolvidos métodos objetivos que passaram a constituir as técnicas de

análise sensorial. Inicialmente, a análise sensorial se baseava na avaliação subjetiva das observações relacionadas à aparência, odor, textura/consistência e sabor do alimento (OLIVEIRA, 2008).

Esta abordagem inicial evoluiu para uma discussão com fundamentação em testes estatísticos, que no Brasil são regulamentados pela norma ABNT-NBR 12806 (1993) que define análise sensorial como sendo “uma disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição”. Seja qual for o método a ser escolhido para análise sensorial do produto em desenvolvimento, o mesmo deve se basear na resposta de questões fundamentais, conforme mostrado na Figura 2.20 (OLIVEIRA, 2010).

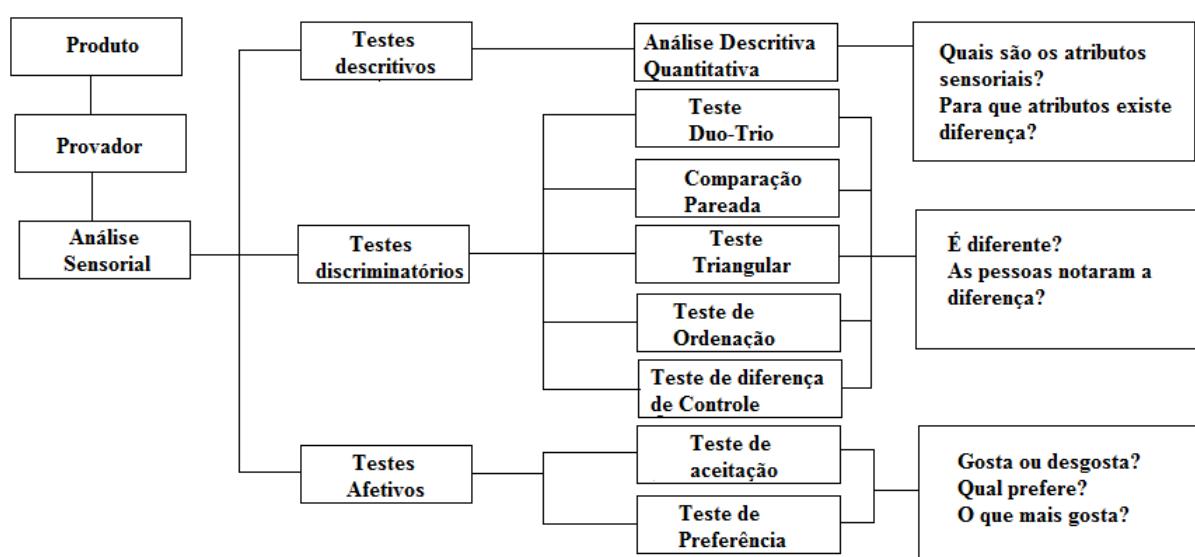


Figura 2.20: Metodologias de Análises Sensoriais.

Fonte: OLIVEIRA (2010).

Atualmente, a análise sensorial é utilizada como instrumento chave na seleção de produtos, na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, na definição do padrão de identidade e qualidade do alimento e, na avaliação da aceitação pelo consumidor (OLIVEIRA, 2008).

Os testes descritivos referem-se os componentes ou parâmetros sensoriais e medem a intensidade em que são percebidos atributos como aparência, odor e aroma, textura oral e manual, sensações tátteis e superficiais, sabor e gosto. As metodologias associadas a estes testes exigem que os julgadores sejam treinados de forma a usar uma escala de quantificação dos atributos de forma consistente. Esta escala pode utilizar pontos ou ser apresentada de forma não estruturada em formato de régua.

Os testes discriminatórios medem atributos específicos simples por comparações que indicam se existem ou não diferenças estatísticas entre amostras. Entre os teste apresentados na Figura 2.20, o teste triangular é utilizado para essa finalidade por se tratar de um teste simples que não caracteriza os atributos responsáveis pela diferença, avaliando o produto globalmente. O teste consiste na verificação da existência de diferença sensorial entre duas amostras que sofreram tratamentos diferentes (mudança de ingredientes, processamento, embalagem ou estocagem). Nesta metodologia, três amostras, nas quais duas são iguais e uma é diferente, são codificadas e apresentadas de forma aleatória para um conjunto de 20 a 40 julgadores voluntários e não treinados para que avaliem qual é a amostra diferente dentre as três degustadas (Figura 2.21). A análise dos resultados é estatística e se baseia no número de acertos, sendo a probabilidade de acerto igual a 1/3 (OLIVEIRA, 2010). O desenvolvimento estatístico segue uma distribuição binomial e é apresentado de forma mais detalhada no Anexo 2.

Amostra:	Julgador:	Data:
Você está recebendo três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente.		
_____	_____	_____
Comentários:		

Figura 2.21: Modelo para realização do teste triangular
Fonte: ABNT, NBR 12995, 1993.

Os testes afetivos são uma forma usual de se medir a opinião de um grande número de consumidores com respeito as suas preferências, gostos e opiniões. São empregadas escalas, sendo as mais utilizadas as de intensidade, hedônica, do ideal e de atitude ou de intenção. Os julgadores não precisam ser treinados bastando ser consumidores frequentes do produto em avaliação. Os testes são divididos em duas categorias: testes de aceitação e testes de preferência. O teste de aceitação por escala hedônica define de forma globalizada ou em relação a um atributo específico o grau de gosto ou desgosto de um determinado produto. As escalas mais utilizadas são as de 7 e 9 pontos, conforme apresentado na Figura 2.22. Quando o teste é aplicado a uma única amostra, o mesmo revela apenas o estado afetivo do

consumidor em relação ao produto, já para os casos em que existem duas ou mais amostras, as mesmas são codificadas e dispostas aleatoriamente para serem avaliadas segundo a escala apresentada. O Anexo 3, apresenta detalhes do tratamento estatístico dos resultados para situações em que existem mais de duas amostras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Amostra:	Julgador:	Data:
Você está recebendo quatro amostras codificadas. Avalie globalmente cada uma segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo		
(9) gostei extremamente	_____	()
(8) gostei moderadamente	_____	()
(7) gostei regularmente	_____	()
(6) gostei ligeiramente	_____	()
(5) não gostei, nem desgostei	_____	()
(4) desgostei ligeiramente	_____	()
(3) desgostei regularmente	_____	()
(2) desgostei moderadamente	_____	()
(1) desgostei extremamente	_____	()
Comentários:		

Figura 2.22: Modelo de escala hedônica

Fonte: ABNT, NBR 14141, 1998.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em três etapas, conforme mostrado pela Figura 3.1. A primeira etapa consistiu de testes preliminares com três experimentos distintos: formulações de bombom com cultura mista (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*) na forma liofilizada; formulações de bombom com cultura de *L. acidophilus* LA-5 na forma liofilizada, com adição de ácido ascórbico em diferentes concentrações para avaliação do efeito protetivo do mesmo na sobrevida das células; formulação de barras de chocolate com cultura *L. acidophilus* LA-5 com células obtidas por meio de fermentação em meio M1 (MRS). Na segunda etapa, foi feito um estudo da cinética de morte celular em formulações do tipo barra, preparadas com diferentes tipos de chocolates e realizada a contagem celular ao longo de 28 dias de armazenamento. As células usadas nas formulações eram obtidas por meio de fermentação, depois centrifugadas e adicionadas ao produto diretamente ou após secagem prévia. Nesta etapa, também foram realizadas análises físico-químicas. A terceira etapa consistiu da avaliação da cinética de crescimento e morte celular de formulação de chocolate ao leite (C2) preparadas com células provenientes de três meios distintos (M1, M2 e M3), além de testes de análise sensorial. Os itens que se seguem, apresentam de forma detalhada as metodologias e procedimentos adotados durante todas as etapas.

Etapa 1: Testes Preliminares	Etapa 2: Cinética da morte celular e avaliações complementares	Etapa 3: Avaliação das células em diferentes condições e análise sensorial
<ul style="list-style-type: none">• Formulações de bombom com cultura mista (B1, B2, B3)• LA 5 e adição de ácido ascórbico (B4, B5, B6, B7)• Formulações em barra com células fermentadas (C2, C3, C4)	<ul style="list-style-type: none">• C1, C2, C3, C4• Quantificação celular• Armazenamento 28 dias• Sem secagem• Com secagem• Atividade de água• Teor de lipídeos	<ul style="list-style-type: none">• M1, M2, M3• Quantificação crescimento• Armazenamento 28 dias• Análise sensorial

Figura 3.1: Sequência dos testes experimentais

3.1. Fermentações

As fermentações foram realizadas com micro-organismos *Lactobacillus acidophilus* LA-5, provenientes do produto comercial Biorich, em reator batelada com volume total de 250 mL e volume útil de 200 mL com movimento orbital (shaker com rotação de 300 rpm) a temperatura ambiente de 25±4°C por 48 horas. Nas fermentações foram utilizadas meio M1, M2 e M3, os quais são apresentados pela Tabela 3.1. O crescimento celular nos três meios foi monitorado, através de contagem por plaqueamento, nos tempos de 0, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36 e 48 horas.

Tabela 3.1: Composição dos meios de cultura

Meio	Substância	Quantidade
M1 (MRS)	Peptona de caseína	10 g/L
	Extrato de carne	10 g/L
	Extrato de levedura	5 g/L
	Glicose	20 g/L
	Tween 80	1 g/L
	Fosfato de potássio dibásico	2 g/L
	Acetado de sódio	5 g/L
	Citrato de amônio	2 g/L
	Sulfato de manganês	0,05 g/L
M2	Sulfato de magnésio	0,2 g/L
	Glicose	20 g/L
	Levedo de cerveja	6 g/L
M3	Extrato de <i>Camellia sinensis</i> *	25% (v/v)
	Glicose	20 g/L
	Levedo de cerveja	6 g/L

* preparado com 10,5 g de folhas secas para 500 mL de água destilada

O meio M1 (MRS) é largamente utilizado em estudos com lactobacilos e foi utilizado por Aragon-Alegro (2007) no desenvolvimento de um mousse de chocolate probiótico. Os meio M2 e M3 foram elaborados com o intuito de se obter meios mais simples, que fossem capazes de gerar células que pudessem ser adicionada às formulações a serem degustadas. O extrato de *Camellia sinensis* possui agentes anti-oxidantes e foi adicionado ao meio M2 para se avaliar o efeito protetivo do mesmo nas formulações de chocolate ao leite testadas.

3.2. Condições de preparação das células das fermentações para uso nas formulações probióticas em barra

A preparação das células fermentadas para uso nas formulações probióticas foi realizada por um processo de separação em ultracentrífuga seguido por secagem em estufa

com circulação forçada de ar. Foi utilizado uma ultracentrífuga refrigerada Hitachi CF 15RXII a 12000 rpm por 5 minuto e a temperatura de 20°C. As condições operacionais da secagem foram circulação forçada, temperatura de 44°C +/- 1°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 41%. As células preparadas foram quantificadas por meio de contagem celular por plaqueamento após os tempos de secagem de 2, 8 e 24 horas para verificação da sobrevivência celular após a secagem. A umidade relativa do ar na estufa foi avaliada por medida da temperatura de bulbo úmido e temperatura de bulbo seco.

3.3. Formulações probióticas em bombom

Foram preparadas sete formulações de bombons de chocolate recheados com adição de células probióticas ao recheio. As células foram utilizadas na forma liofilizada constituídas por lactobacilos provenientes de duas variedades de produtos comerciais. Na Tabela 3.2 é apresentada a composição dos recheios e os lactobacilos presentes nos produtos comerciais utilizados. O ácido ascórbico foi adicionado as formulações (B7 a B9) visando avaliar o efeito do mesmo na sobrevivência das células e a formulação B4 foi usada como controle.

Tabela 3.2: Formulações utilizadas

Simbologia	Composição	Nome do produto comercial
B1	5 g chocolate (30,77%) 8,75 g de leite condensado (53,85%) 2,5 g de coco ralado (15,38%)	Lacto-Pró (cultura mista)
B2	5g chocolate (28,17%) 8,75 g de leite condensado (49,30%) 4 g de chocolate (22,54%)	Lacto-Pró (cultura mista)
B3	5 g chocolate (32,79%) 8,75 g de leite condensado (57,38%) 1,5 g de leite em pó (9,84%)	Lacto-Pró (cultura mista)
B4	5 g chocolate (30,77%) 8,75 g de leite condensado (53,85%) 2,5 g de coco ralado (15,38%)	Biorich
B5	5 g chocolate (30,76%) 8,75 g de leite condensado (53,83%) 2,5 g de coco ralado (15,38%) 6,25 mg Acido ascórbico (0,04%)	Biorich
B6	5 g chocolate (30,75%) 8,75 g de leite condensado (53,80%) 2,5 g de coco ralado (15,37%) 12,5 mg Acido ascórbico (0,08%)	Biorich
B7	5 g chocolate (30,72%) 8,75 g de leite condensado (53,76%) 2,5 g de coco ralado (15,36%) 25 mg Acido ascórbico (0,15%)	Biorich

Nota : Lactobacilos presentes no Lacto-Pró: *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*.

Lactobacilos presentes no Biorich: *L. acidophilus* LA-5

Nos ensaios com as formulações B1, B2 e B3 foram realizadas contagens das células nos tempos 3 e 26 dias de armazenamento (armazemagem em condições ambientais, $25^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), utilizando a metodologia do número mais provável (NMP) e plaqueamento, descritas no item 3.7, as formulações B4, B5, B6 e B7 foram avaliadas para o tempo de 17 dias e a adição de ácido ascórbico objetivava avaliar o efeito do mesmo na sobrevivência das células.

3.4. Formulações probióticas em chocolate em barra

Foram preparadas oito formulações probióticas de *Lactobacillus acidophilus* LA5 em barras de diferentes variedades de chocolate pela adição de células fermentadas em meio M1 (MRS), com adição das mesmas sem secagem prévia ou com secagem prévia de 2h, conforme mostrado na Tabela 3.3.

A separação das células foi realizada por centrifugação a 12000 rpm com adição de 10^7 células /g de chocolate. Para cada formulação foram feitas contagens para avaliar a sobrevida das células, imediatamente após o preparo e ao longo de 7, 15, 21 e 28 dias através do método de plaqueamento descrito no item 3.7.

Tabela 3.3: Formulações de chocolate tipo barra

Simbologia	Tipo de chocolate	Tempos de secagem
C1	Chocolate branco (0% de sólidos de cacau)	0 e 2h
C2	chocolate ao leite (25 % de sólidos de cacau)	0 e 2h
C3	chocolate meio amargo (53 % de sólidos de cacau)	0 e 2h
C4	chocolate amargo (70% de sólidos de cacau)	0 e 2h

Nota- secagem em estufa com circulação forçada a $44^{\circ}\text{C} +/- 1^{\circ}\text{C}$ com umidade relativa do ar de 41%

3.5. Estudo da formulação de chocolate em barra ao leite

A formulação de chocolate ao leite sem secagem prévia das células fermentadas foi preparadas com o uso de células geradas em meio M1 (MRS) e meios com adição de glicose e levedo de cerveja com ausência e presença de extrato de *Camellia sinensis* (meios M3 e M2 descritos no item 4.1). O extrato de *Camellia sinensis* foi adicionado ao meio M2 para se verificar o efeito protetivo do mesmo na sobrevida das células. Cada uma destas formulações foi avaliada em termos de contagem celular por plaqueamento para 0, 4, 9, 14, 18, 23 e 28 dias de armazenamento a temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.6. Análise sensorial

3.6.1. Teste triangular

O teste triangular foi realizado em cabines sensorial do Centro Tecnológico de Alimentos “Fábio de Araújo Motta” (CETAL/SENAI¹), localizado na cidade de Uberlândia, com 25 alunos voluntários, com idades entre 16 e 49 anos, do segundo período do curso Técnico de Alimentos. Foram apresentadas a cada voluntário três amostras de chocolates em barra codificadas, sendo duas iguais e uma diferente (Figura 3.2). Os alunos eram orientados a escolher dentre as três amostras degustadas a que era diferente na presença de uma luz vermelha para dificultar a vizualização de qualquer diferença visual entre as amostras.



Figura 3.2: Amostras codificadas oferecidas aleatoriamente aos candidatos

3.6.2. Teste afetivo

O teste foi realizado na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e no Centro Tecnológico de Alimentos “Fábio de Araujo Motta” (CETAL/SENAI), ambos localizados na cidade de Uberlândia, com 67 alunos e funcionários voluntários. Foi apresentada aos voluntários uma amostra de chocolate em barra com células de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 provenientes de fermentação em meio M3, juntamente com uma ficha de escala hedônica que apresentava em seus extremos de “gostei extremamente” a “desgostei extremamente”, além de uma pergunta que verificava a intenção de compra do produto. A Figura 3.3, representa a cópia exata da ficha utilizada no teste afetivo.

¹ Rua Ernesto Vicentini, 245 – B. Roosevelt – Uberlândia - MG

Idade: _____	Sexo: _____	Data: _____
<p>Marque a opção que demonstre sua avaliação global da amostra, segundo o grau de gostar ou desgostar.</p> <p>(9) Gostei extremamente (8) Gostei moderadamente (7) Gostei regularmente (6) Gostei ligeiramente (5) Não gostei, nem desgostei (4) Desgostei ligeiramente (3) Desgostei regularmente (2) Desgostei moderadamente (1) Desgostei extremamente</p> <p>Com base na avaliação realizada, você compraria este produto? _____</p>		

Figura 3.3: Ficha utilizada no teste afetivo

3.7. Quantificação do número de células

As contagens celulares foram realizadas por número mais provável (NMP) em triplicata para cada diluição e por plaqueamento em profundidade. Na técnica de NMP um grama da amostra era dissolvido em 10 mL de água peptonada (1% p/v) e desta solução era utilizada 1 mL em sucessivas diluições com solução redutora (Tabela 3.4) seguido da distribuição do meio diluído em M1 (MRS), conforme mostrado na Figura 3.4. No plaqueamento um grama de amostra era dissolvido em 10 mL de leite desnatado em pó reconstituído a 10%, a temperatura de 45°C (Health Protection Branch, MFO-11, 1981), sendo que 0,1 mL de cada diluição preparada era utilizada no plaqueamento em meio MRS adicionado de 20 g/L de ágar conforme mostra Figura 3.5.

Tabela 3.4: Composição da solução redutora

Substância	Quantidade
Solução de resazurina 0,1 %	4 mL/L
Ácido ascórbico	0,1 g/L
Cloreto de sódio	8,5 g/L
Tioglicolato de sódio	0,124 g/L

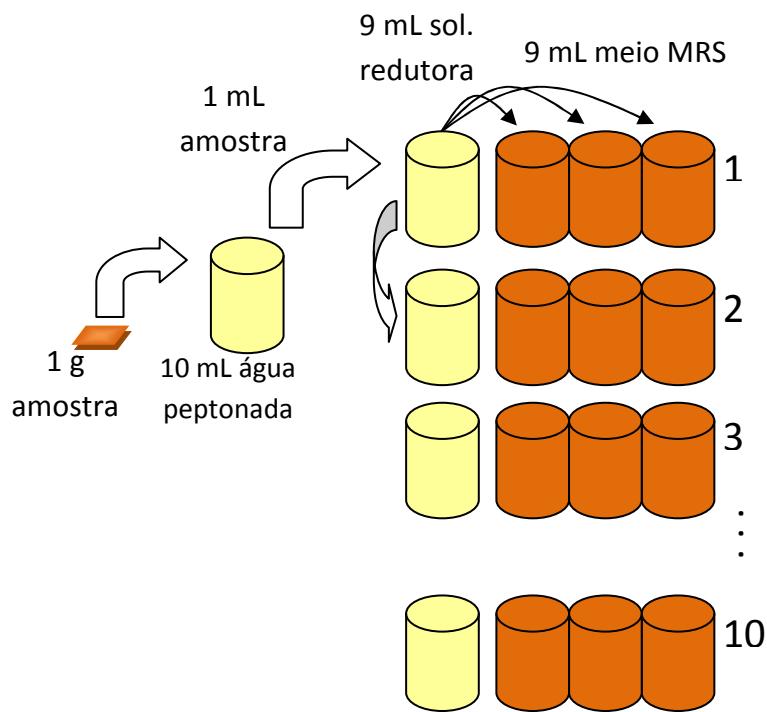


Figura 3.4: Procedimento para contagem de lactobacilos com utilização de NMP.

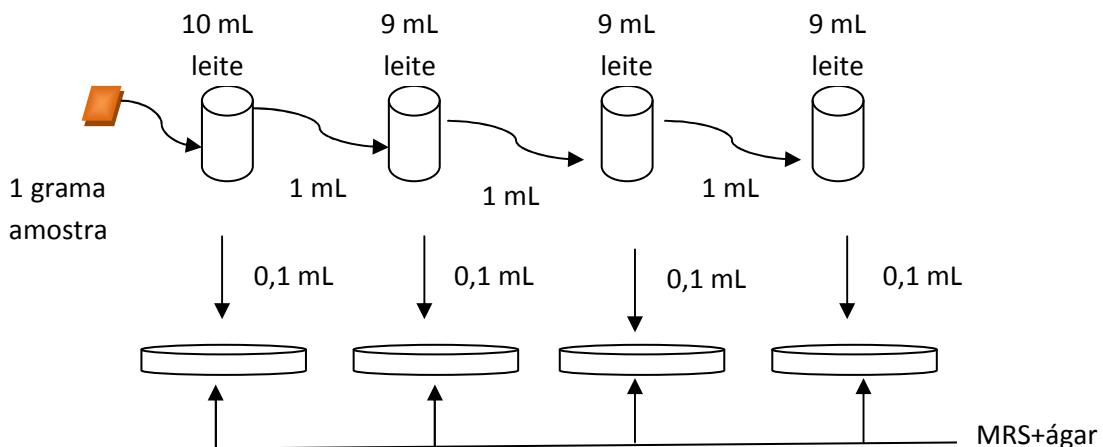


Figura 3.5: Procedimento para contagem de lactobacilos com utilização de placas.

3.8. Atividade de água e avaliação visual

A análise da atividade de água nos produtos preparados foi realizada com intuito de se verificar a segurança e estabilidade das formulações preparadas quanto deterioração. O ensaio foi realizado por via instrumental utilizando equipamento Novasina calibrado com os sais relacionados na Tabela 3.5. O Anexo 1 apresenta as curvas de calibração.

Tabela 3.5: Relação de atividade de água de sais para construção de curva de calibração

Sais	a_w
Cloreto de magnésio	0,328
Carbonato de potássio	0,432
Cloreto de sódio	0,753

Fonte: Measuring water activity (a_w) using the novasina a_w center, 2006

A avaliação visual foi realizado ao longo das quatro semanas de estocagem dos produtos através a observação de três parâmetros: crescimento de fungos na superfície, crescimento de fungos no interior e mudança de cor aparente.

3.9. Teor de Lipídeos

A análise do teor de lipídeos foi feita em extrator de Soxhlet com hidrólise prévia em metodologia indicada pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) (Lipídios ou extrato etéreo com hidrólise ácida prévia – Método B). Neste método foram pesadas cerca de 15 gramas de chocolate em barra. A amostra foi diluída em 100 mL de água quente e adicionou-se 60 mL de ácido clorídrico e algumas pérolas de vidro. A solução foi coberta por um vidro de relógio e colocada em chapa elétrica, aquecendo-se até ebulação, permanecendo em ebulação por cerca de 30 minutos. O vidro de relógio foi lavado sobre a solução da amostra com 160 mL de água quente. A solução foi filtrada em papel de filtro previamente umedecido. O bêquer e o resíduo do papel de filtro foram lavados com água quente e nitrato de prata 0,1 M até que o filtrado exibisse uma reação neutra, indicada com papel indicador, ou ausência de cloretos. O papel de filtro contendo os resíduos foi colocado sobre outro papel de filtro seco e o conjunto colocado em vidro de relógio e seco em estufa a 105°C. Após a secagem, foram feitos cartuchos com os papeis, de forma a envolver o papel de filtro com a amostra. O cartucho foi anexado ao extrator Soxhlet e o mesmo acoplado ao balão de fundo chato, previamente seco a 105°C e tarado. Adicionou-se éter de petróleo em quantidade suficiente para a extração e o conjunto foi acoplado em um refrigerador de bolas, mantendo o sistema sob aquecimento em chapa elétrica por 4 horas. O éter foi redestilado e o balão com o resíduo extraído foi seco em estufa a 105°C até peso constante, sendo resfriado em dessecador até a temperatura ambiente.

O resultado da análise é expresso em porcentagem (m/m) e é obtido pelas Equações 3.1 e 3.2.

$$m_{lipídeos} = m_{balão+lipídeo} - m_{balão} \quad (3.1)$$

$$\%lipídeos = \frac{m_{lipídeos}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (3.2)$$

Nas quais: $m_{lipídeos}$ é a massa de lipídeos extraída; $m_{balão+lipídeo}$ é a massa do balão com o resíduo da extração após a secagem; $m_{balão}$ é a massa do balão previamente seco e $m_{amostra}$ é a massa de chocolate pesada.

3.10. Tratamento estatístico dos dados

Na avaliação cinética da morte celular das formulações de chocolate ao leite com células provenientes de três meios fermentativos distintos (M1, M2 e M3), o tratamento estatístico dos dados com as funções sobrevida, distribuição de densidade probabilidade e risco foi feito pela significância dos parâmetros, erros padrões dos mesmos e coeficiente de correlação do modelo utilizando, para tanto, regressão não linear com função objetivo soma dos quadrados dos desvios com ajuste feito pelo método de Newton segundo rotina padrão nls do *software* estatístico R na sua versão 2.13.2 (*R Developement Core Team*, 2011). A descrição da análise de sobrevivência foi feita pelo mesmo *software* utilizando a biblioteca *survival* e as funções *survreg()* e *survfit()* que utiliza máxima verossimilhança.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Testes Preliminares

A Figura 4.1 mostra a contagem celular obtida para os tempos de 3 e 26 dias de armazenamento das formulações de chocolate com recheio B1, B2 e B3 . Pelos resultados, pode-se verificar que os micro-organismos, existentes em uma cultura mista na forma liofilizada, são capazes de sobreviver as condições normais de armazenagem de um bombom. O que significa que é viável trabalhar com probióticos, provenientes de uma cultura mista e na forma liofilizada, em produtos de chocolate com recheio, visto que após 26 dias de conservação observa-se que existe uma quantidade considerável de micro-organismos presentes.

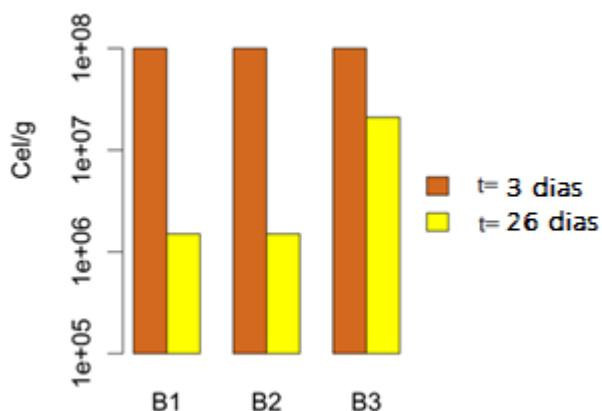


Figura 4.1: Contagens celulares nas formulações B1, B2 e B3.

A Figura 4.2 mostra o resultado obtido para as formulações B4, B5, B6 e B7 preparadas com a forma liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 avaliadas para um tempo de armazenamento de 17 dias. Esta figura mostra que a cepa LA-5 apresenta uma quantidade de células viáveis por grama de produto que justifica o estudo da mesma como produto estável e que o ácido ascórbico adicionado nas formulações B5, B6 e B7 (0,04%, 0,08% e 0,15% de ácido ascórbico) para conservar as células não foi capaz de reduzir a morte celular nas condições e concentrações testadas quando comparado a formulação B4 que não possuia ácido ascórbico. Embora a adição de ácido ascórbico em formulações de iogurtes com *L. acidophilus* melhoraram a viabilidade (Dave e Shah,1997), para formulações de chocolate este comportamento não foi observado.

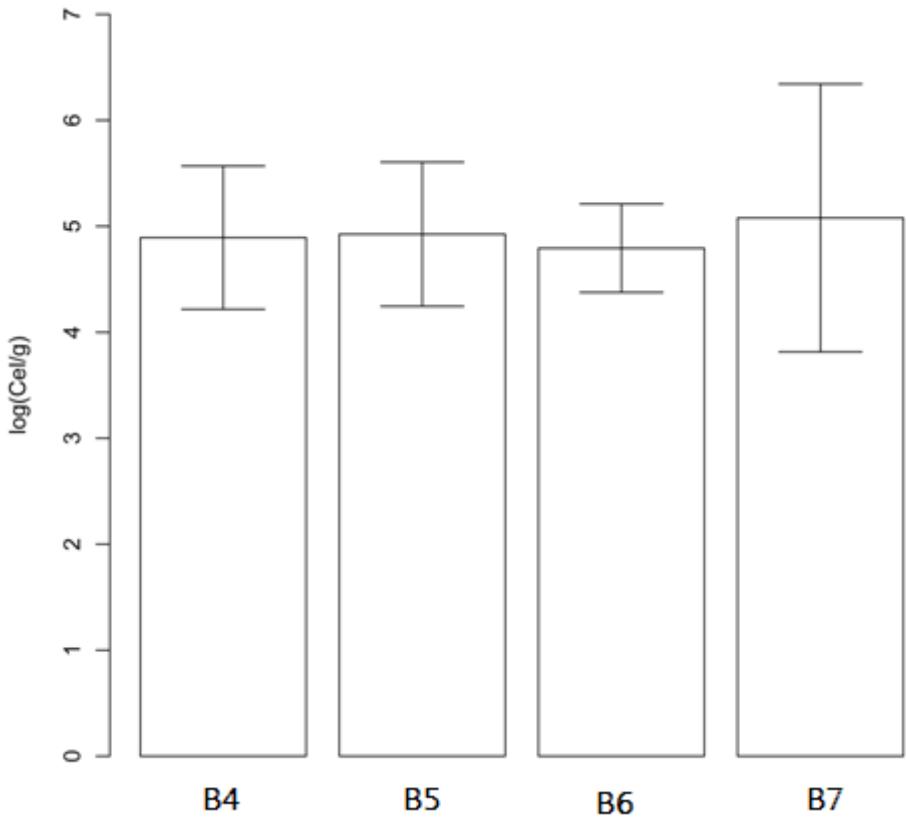


Figura 4.2: Resultados das contagens celulares em triplicata das formulações B4, B5, B6 e B7 para 17 dias de armazenamento.

As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam a quantificação da concentração celular da cepa de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, na forma liofilizada, em chocolates em barra com as células geradas por fermentação em meio M1 (MRS) seguidas de separação em centrifuga e adição das mesmas ao chocolate, em diferentes formulações. Percebe-se que a passagem do uso da forma liofilizada para forma com células fermentadas e substituição do produto tipo bombom para o produto tipo em barra para as variedades de chocolate ao leite (formulação C2), meio amargo com 53% de cacau (formulação C3) e amargo com 70% de cacau (formulação C4) são capazes de gerar chocolates probióticos com quantidade de células que caracterizam uma vida útil compatível com o uso do produto com fonte de células de lactobacilos. Bombons caseiros geralmente são produzidos em pequenas quantidades e consumidos de forma rápida (recém-elaborados). Richter e Lannes (2007), consideram como recém-elaborados, bombons com no máximo 5 dias de preparo.

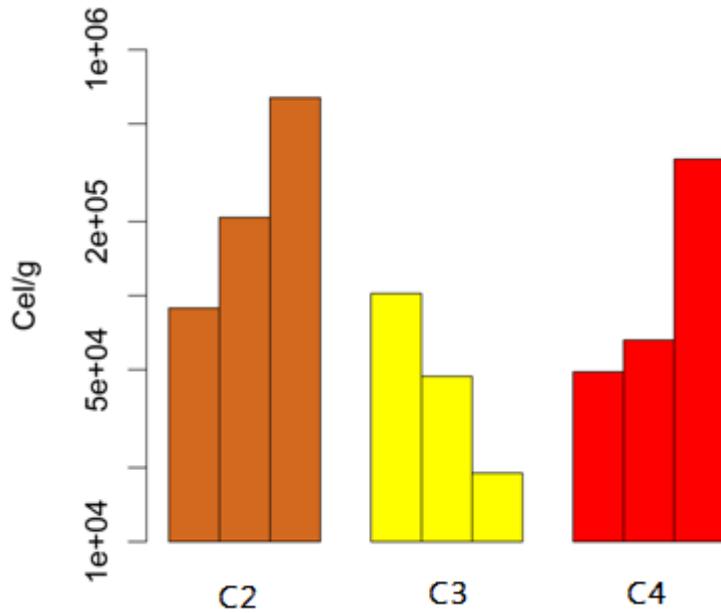


Figura 4.3: Contagem celular em formulações C2, C3 e C4, após 16 dias de armazenamento.

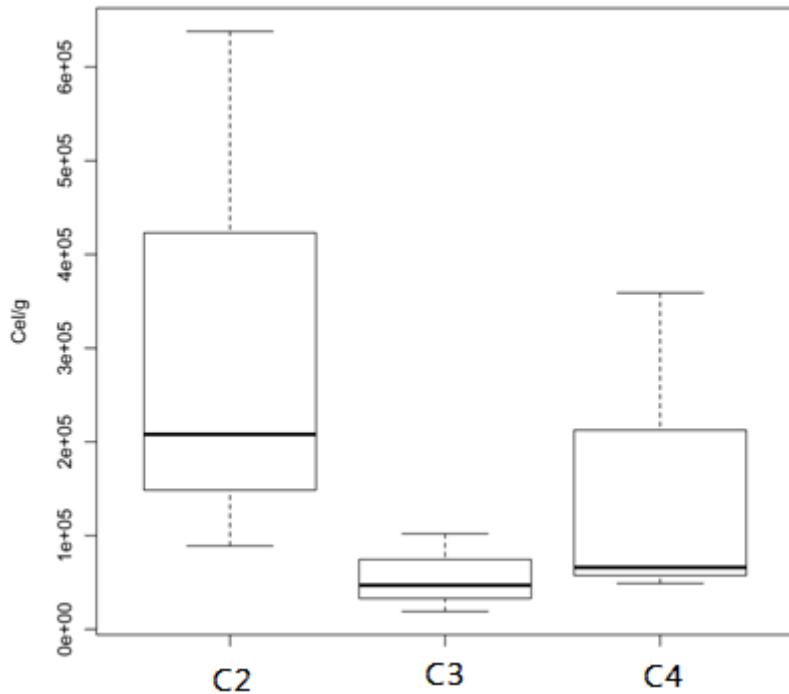


Figura 4.4: Intervalo dos dados experimentais: contagem celular em formulações C2, C3 e C4, após 16 dias de armazenamento.

A Figura 4.5 ilustra e resume a sequência de resultados apresentados e discutidos nas Figuras 4.1 a 4.4. Pode-se observar que é viável estudar o produto nos três tipos de formulações e condições testadas. As formulações B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7 possuem vida de prateleira similar as formulações C2, C3 e C4. Optou-se pela continuidade do trabalho com o uso de chocolate sem recheio, devido a maior facilidade de preparo e maior vida útil que

barras apresentam em relação aos bombons com recheio, pois nestes últimos o recheio tende a deteriorar o produto com maior rapidez.

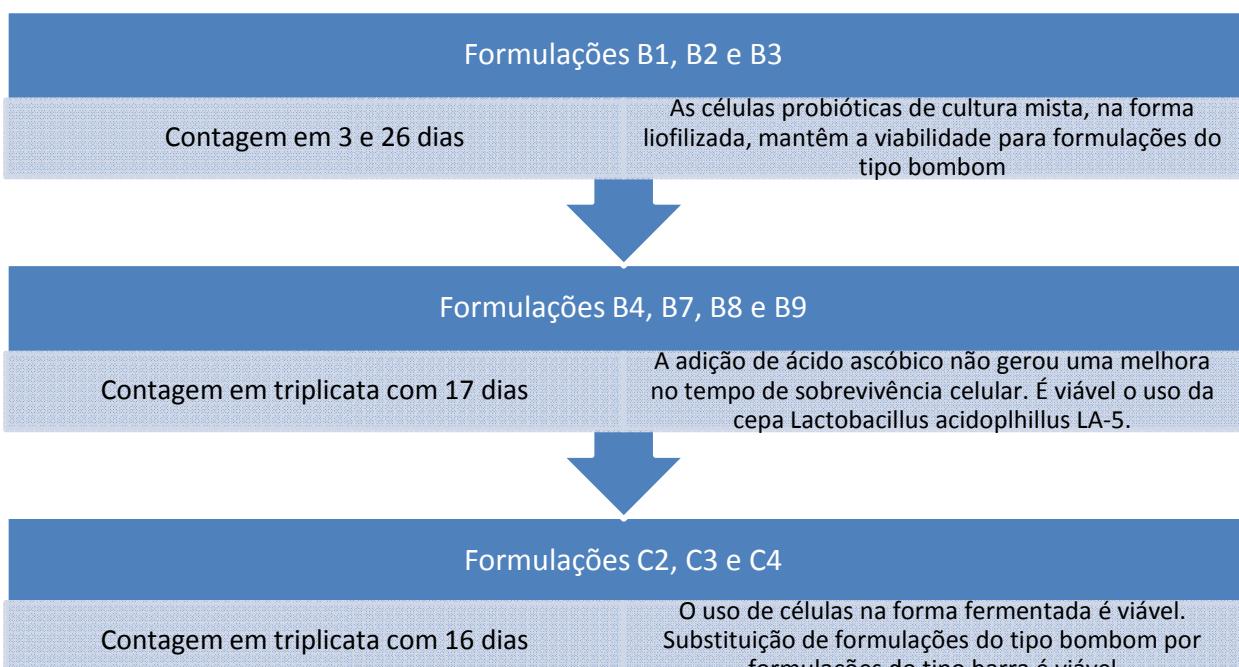


Figura 4.5: Síntese dos resultados preliminares.

4.2. Avaliação da estabilidade

A quantificação das concentrações celulares em amostras das formulações das variedades chocolate branco (C1), ao leite (C2), meio amargo (C3) e amargo (C4) mostra que houve um decréscimo celular ao longo de um tempo de armazenamento de 28 dias, como mostra a Figura 4.6, para formulação que continham células fermentadas em meio M1, separadas por centrifugação e adicionadas ao chocolate, sem secagem prévia das mesmas. Ao final de 21 dias de preparo, todas as formulações testadas apresentavam contagens celulares superiores a 10^6 cel de micro-organismos para uma porção usual (30g) que representa o tamanho médio de uma barra de chocolate. Este valor é satisfatório para uso probiótico das diferentes formas de chocolate testadas como produtos caseiros comerciais que contenham células. A Figura 4.6 mostra ainda que a variação do tipo de chocolate altera a estabilidade celular sendo que a formulação C2 é a mais estável e a formulação C1 é a mais instável, pois C1 apresentou maiores decréscimos nas concentrações celulares e a formulação C2 apresentou menores decréscimos para o armazenamento de 28 dias.

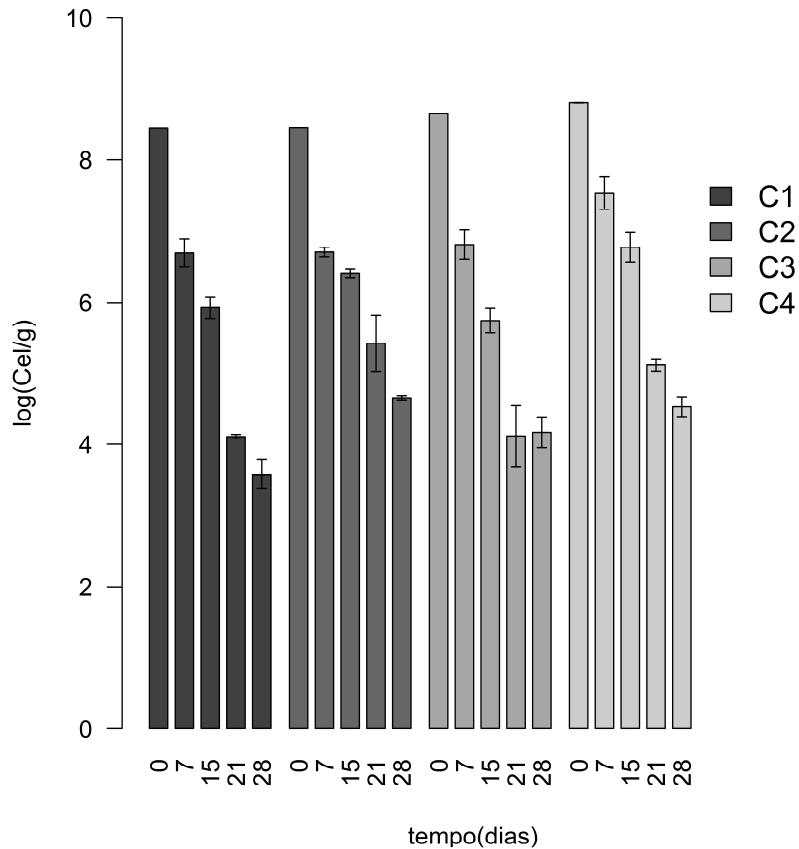


Figura 4.6: Resultado das contagens celulares em barras sem secagem prévia das células expressos em termos do valor médio e erro padrão.

Desejava-se avaliar a influência da secagem prévia das células a serem adicionadas às formulações e, assim, células foram fermentadas em meio M1, separadas em centrífuga e secas em estufa de circulação força ($T = 44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), sendo quantificadas por plaqueamento para os tempo de 2, 8 e 24 horas. Os resultados, apresentados na Figura 4.7, mostram que a secagem não foi capaz de destruir uma quantidade significativa de células, mantendo uma concentração celular superior 10^6 cel/g. A avaliação visual mostrou que um tempo de 2 horas era suficiente para a secagem das porções testada.

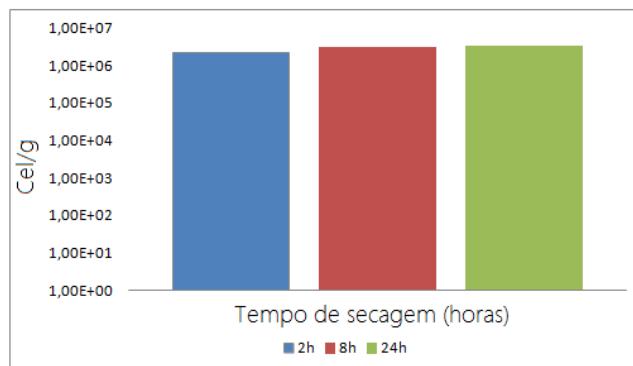


Figura 4.7: Contagem celular após a secagem das células em diferentes tempos

Então, as mesmas formulações apresentadas pela Figura 4.6 foram preparadas com células fermentadas em meio M1 (MRS) e centrifugadas, seguido de secagem por 2 horas. A Figura 4.8 apresenta o resultado das contagens celulares das formulações C1, C2, C3 e C4 preparadas com as células previamente secas. A comparação entre estes dois experimentos, Figuras 4.6 e 4.8, mostra que em ambos a formulação C2 é que apresentou maior estabilidade ou seja menores reduções da concentração celular e que C2 teve redução de sua estabilidade associada a secagem. A redução de estabilidade associada a secagem também foi observada nas formulações C3 e C4.

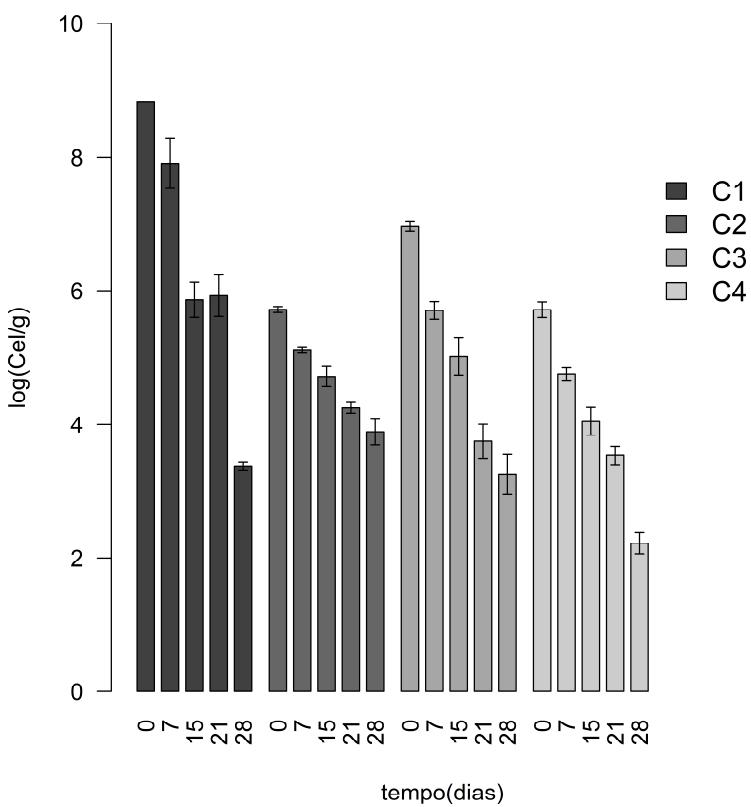


Figura 4.8: Resultado das contagens celulares em barras com secagem prévia das células por 2 horas expresso em termos do valor médio e erro padrão.

A medida de atividade de água, apresentada na Figura 4.9, foi realizada com as barras sem células e com células (sem secagem prévia e com secagem). Analisando a Figura 4.9, percebe-se que os diferentes tipos de chocolate apresentam baixa atividade de água (valores inferiores a 0,5), o que favorece a estabilidade das formulações. As diferenças entre as atividades medidas não são significativas e, portanto, não são capazes de explicar a maior estabilidade de um tipo de chocolate em relação ao outro tipo. Segundo Gava (2008), a atividade de água menor que 0,6 garante a estabilidade, fato confirmado na Tabela 4.1, que

descreve as mudanças observadas visualmente nas formulações durante o período de armazenamento.

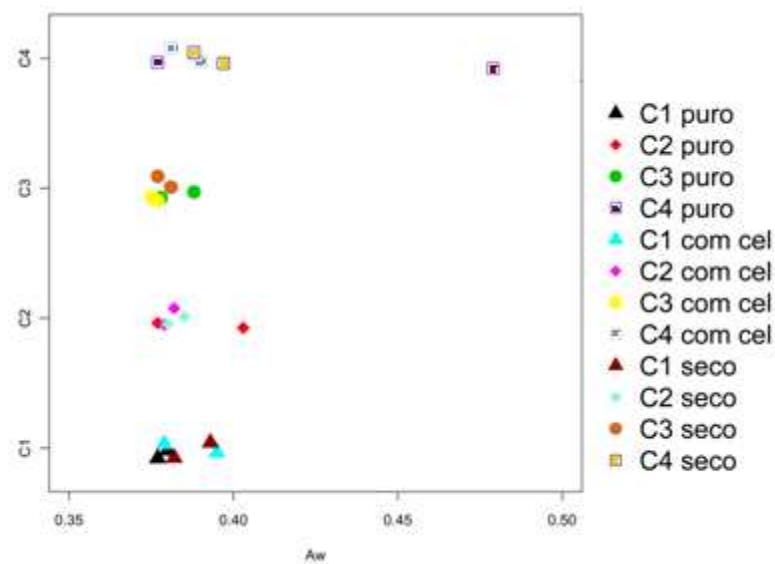


Figura 4.9: Medidas das atividade de água.

Tabela 4.1: Avaliação visual das formulações

Formulação	Característica	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
C1 (0 hora secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -
C2 (0 hora secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -
C3 (0 hora secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -
C4 (0 hora secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -
C1 (2 horas secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -
C2 (2 horas secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -
C3 (2 horas secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -
C4 (2 horas secagem)	Crescimento de fungos na superfície	- - -	- - -	- - -	- - -
	Crescimento de fungos no interior	- - -	- - -	- - -	- - -
	Mudança de cor aparente	- - -	- - -	- - -	- - -

Nota: Ausência de alteração (- - -); Presença de pontos com alteração (- - +); Alteração na superfície (- + +); Alteração interna e na superfície (+ + +)

A análise do teor de lipídeos foi realizada pela metodologia de extração em extrator de Soxhlet com hidrólise prévia em metodologia indicada pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Os resultados obtidos na análise se encontram na Tabela 4.2, e estão de acordo com valores encontrados pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (2006) e com a Resolução - CNNPA nº 12 (1978) da ANVISA, que estabelece um valor mínimo de 20% p/p de lipídeos em chocolates. A análise do teor de lipídeos, assim como a análise da atividade de água, não foi suficiente para explicar a maior estabilidade de um tipo de formulação em relação ao outro.

Tabela 4.2: Porcentagem de lipídeos pelo método em extrator Soxlet

Amostra	Valor Experimental	Valor Tabelado (NEPA)	Erro relativo*
C1 (branco)	30,73%	-	-
C2 (ao leite)	29,50%	30,3%	2,63%
C3 (meio amargo)	30,59%	29,9%	2,30%
C4 (amargo)	45,84%	-	-

Nota: $\% \text{Erro}_{\text{relativo}} = \frac{|\text{valor}_{\text{tabelado}} - \text{valor}_{\text{experimental}}|}{\text{valor}_{\text{tabelado}}} \times 100$

A Figura 4.10 resume os resultados encontrados no estudo com as formulações de chocolate em barra.

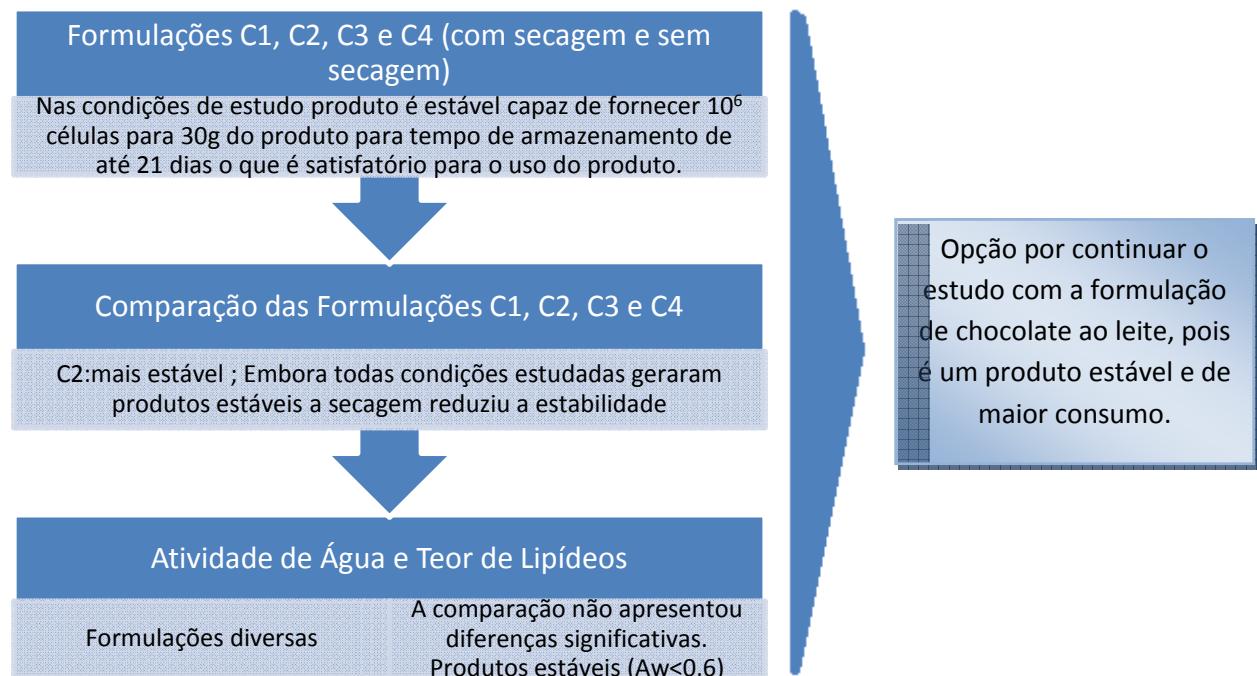


Figura 4.10: Resumo dos estudos realizados com formulações C1, C2, C3 e C4.

4.3. Avaliação da formulação de chocolate ao leite (C2)

4.3.1. Avaliação da cinética de crescimento celular em diferentes meios

Três meios foram utilizados na fermentação das células e o crescimento da massa foi acompanhada ao longo de 48 horas, conforme mostra a Figura 4.11.

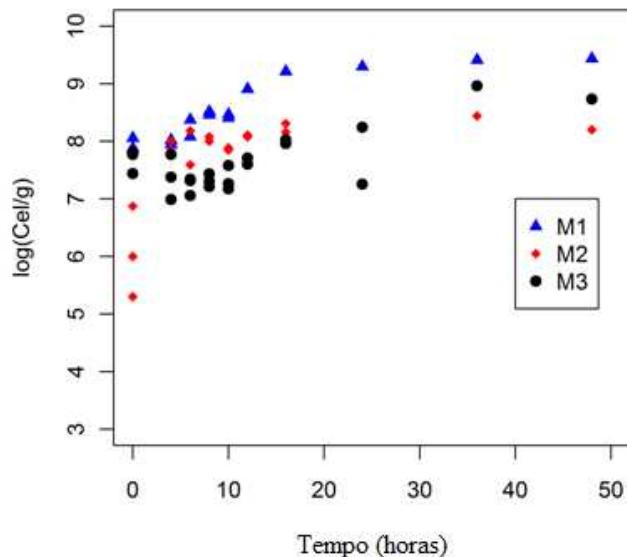


Figura 4.11: Cinética de crescimento celular da cepa LA 5 em diferentes meios

A cinética de crescimento celular nos meios foi avaliada pelos modelos logístico (Equação 4.2) e pelo modelo de Gompertz (Equação 4.3).

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \quad (4.2)$$

Na qual, X_0 é a concentração celular inicial; X_m é a concentração celular final; t é o tempo (h) e μ_m é a velocidade de crescimento celular.

$$y = X_m \times \exp \left[-\left(\frac{X_0}{c} \right) \times \exp(-c \times X) \right] \quad (4.3)$$

Na qual, X_0 é a concentração celular inicial; X_m é a concentração celular final; c é a velocidade de crescimento.

Os modelos se mostraram adequados para a descrição da cinética de crescimento celular para os meios M1 e M2, conforme pode-se observar na Tabela 4.3, porém se mostraram inadequados para descrição da cinética no meio M3. Entretanto, pode-se verificar,

Figura 4.11, que há geração de células nos três meios testados e que a quantidade de células geradas é apropriada para uso das mesmas nas formulações de probióticos (10^8 cel/g) ou seja os três meios propostos favorecem o crescimento celular e, assim, podem ser usados nos estudos seguintes.

Tabela 4.3: Parâmetros obtidos do ajuste de crescimento celular

Modelo	Meio	Parâmetros
Regressão não Linear Modelo Logístico	M1	$X_0(10^8)$ $0,33 \pm 0,17$ ($t= 1,92$; $p<0,1$) μ_0 $0,28 \pm 0,04$ ($t= 6,74$; $p<0,1$) $1/X_m(10^8)$ $0,04 \pm 0,002$ ($t= 23,53$; $p<0,1$)
	M2	$X_0(10^8)$ $0,28 \pm 0,15$ ($t= 1,93$; $p<0,1$) μ_0 $0,19 \pm 0,07$ ($t= 2,75$; $p<0,1$) $1/X_m(10^8)$ $0,47 \pm 0,06$ ($t= 7,51$; $p<0,1$)
	M3	$X_0(10^8)$ $0,51$ μ_0 $0,34$ $1/X_m(10^8)$ $3,14$ (fornece $X_m < X_0$)
	M1	C $0,15 \pm 0,03$ ($t= 5,92$; $p<0,1$) $X_0(10^8)$ $1,23 \pm 0,55$ ($t= 2,22$, $p<0,1$) $X_m(10^8)$ $26,62 \pm 1,26$ ($t= 21,18$; $p<0,1$)
	M2	C $0,12 \pm 0,04$ ($t= 3,06$; $p<0,1$) $X_0(10^8)$ $0,29 \pm 0,16$ ($t= 1,76$; $p<0,1$) $X_m(10^8)$ $2,16 \pm 0,30$ ($t= 7,14$; $p<0,1$)
	M3	C $0,28 \pm 0,11$ ($t= 2,59$; $p<0,1$) $X_0(10^8)$ $43,08 \pm 94,8$ ($t= 0,45$; $p<0,7$) $X_m(10^8)$ $7,31 \pm 0,53$ ($t= 13,71$; $p<0,1$)

As células provenientes dos três meios fermentativos, foram adicionadas a formulações de chocolate ao leite (Figura 4.12), sendo quantificadas em intervalos de 4 a 5 dias durante um tempo de armazenamento de 28 dias.



Figura 4.12: Formulações de chocolate ao leite preparadas com células fermentadas em meios distintos

Foi realizado um estudo estatístico com as funções sobrevida (por modelo não paramétrico e paramétrico: Kaplan-Meier e Weibull, respectivamente), distribuição densidade probabilidade (Weibull) e risco (Weibull) a partir das contagens celulares em intervalos de 4 a 5 dias, por um período de armazenamento de 28 dias. As Figuras 4.13 a 4.15 e a Tabela 4.4, mostram os resultados obtidos pela análise não-paramétrica. Analisando as figuras, pode-se verificar que o maior decréscimo celular ocorreu nos primeiros 4 dias, sendo que os meios M1 e M2 apresentaram um decréscimo mais acentuado que o meio M3. Fazendo-se uma estimativa do número de células vivas (Equação 2.2), a partir dos valores de $S(t)$ para um tempo de armazenamento de 14 dias, percebe-se que a concentração celular continua elevada, sendo que o meio M3 se destaca por ser mais estável que os outros meios, apresentando uma concentração celular maior no tempo estudado.

$$S(t) = \frac{\text{número de células sobreviventes em tempo superior a } t}{\text{número total de células inicial (}t=0\text{)}} = \frac{N(t)}{N_0} \quad (2.2)$$

Tabela 4.4: Função sobrevida ajustada pelo modelo não paramétrico de Kaplan Meier

Meio Fermentativo	$S(t)$ (14 dias)	Intervalo de confiança (95%)	N_0	Estimativa de $N(t=14$ dias)
M1	$0,00858 \pm 0,00054$	[0,007577; 0,00971]	10^9	$8,58 \times 10^6$
M2	$0,00344 \pm 0,00343$	[0,000486; 0,0243]	10^8	$3,44 \times 10^5$
M3	$0,1607 \pm 0,02454$	[0,11915; 0,2168]	10^8	$1,61 \times 10^7$

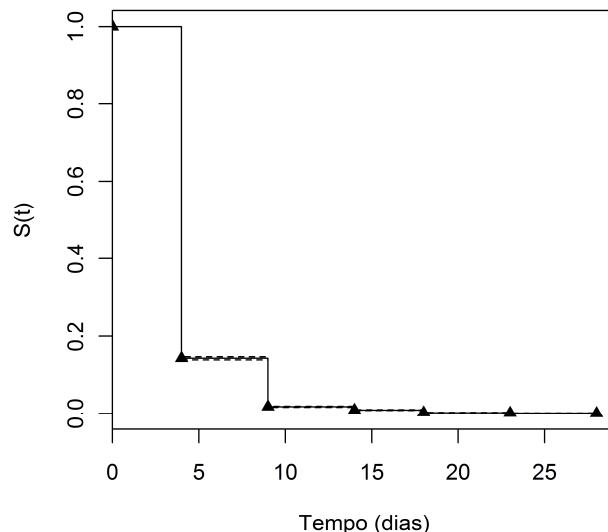


Figura 4.13: Função sobrevida para formulação preparada com células do meio fermentativo

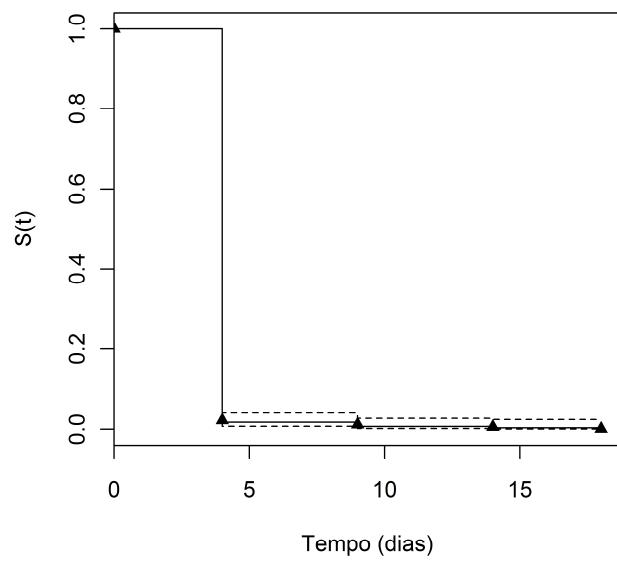


Figura 4.14: Função sobrevida para formulação preparada com células do meio fermentativo M2

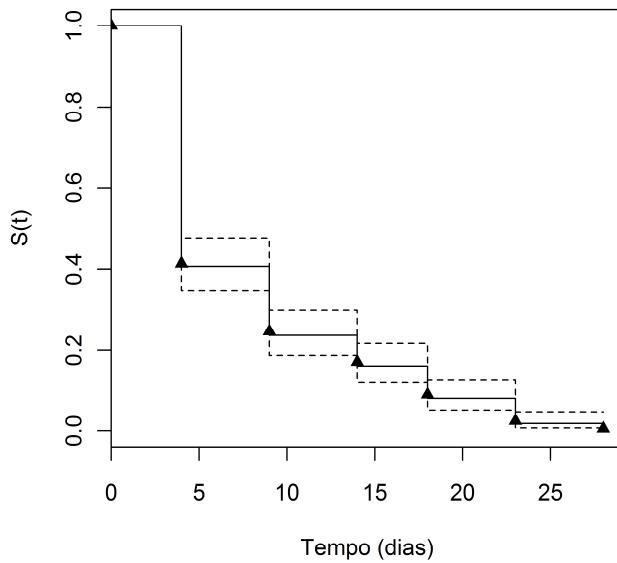


Figura 4.15: Função sobrevida para formulação preparada com células do meio fermentativo M3

Na Tabela 4.5 estão apresentados os parâmetros obtidos pelo ajuste paramétrico de Weibull para a função sobrevida. As Figuras 4.16, 4.17 e 4.18 mostram a representação gráfica da função sobrevida, função densidade probabilidade e função risco ajustadas pelo modelo de Weibull. A Figura 4.16 confirma o resultado encontrado pelo ajuste não paramétrico, mostrando que as células provenientes do meio fermentativo M3 apresentam maior estabilidade nas formulações de chocolate ao leite, quando comparados com os outros

meios analisados. O comportamento em forma de “sino” observado na Figura 4.17 revela que não está havendo morte prematura das células, sendo a morte celular atribuída ao envelhecimento (desgaste; $\gamma > 1$ em todos os casos) das mesmas e do produto. A Figura 4.18, confirma esta informação, mostrando que a medida que o tempo passa existe maior risco de morte celular.

Tabela 4.5: Ajuste da função sobrevida pelo modelo de Weibull

Meio fermentativo	γ (fator de forma)	λ (fator de escala)	R^2
M1	2,1393	5,4800	0,7451
M2	2,2369	4,6861	0,7349
M3	1,4385	9,4111	0,8179

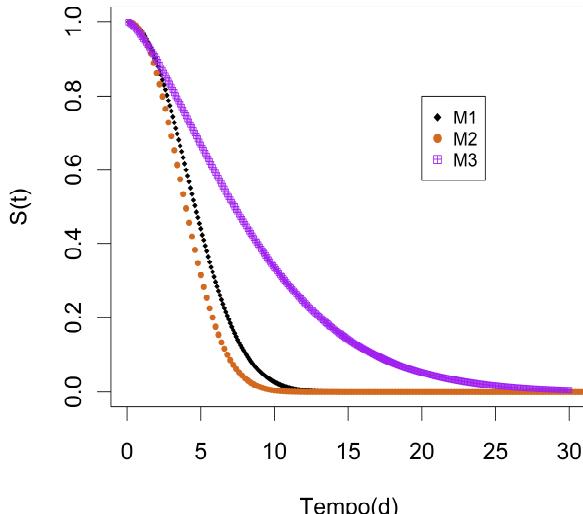


Figura 4.16: Representação gráfica da função sobrevida ajustada pelo modelo de Weibull

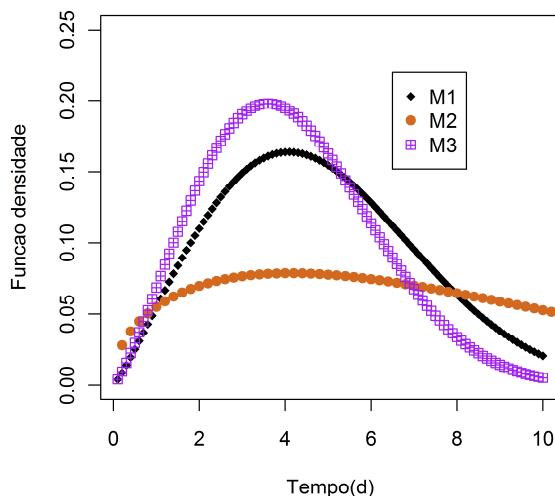


Figura 4.17: Representação gráfica da função densidade probabilidade ajustada pelo modelo de Weibull

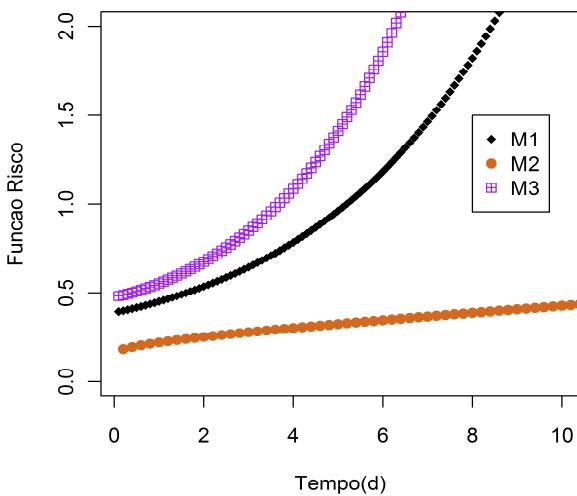


Figura 4.18: Representação gráfica da função risco ajustada pelo modelo de Weibull

Desta forma, tem-se que, embora a geração de células nos meios M1 e M2 sejam adequados para obtenção de células probióticas, as células provenientes do meio M3 geram produtos mais estáveis. Este resultado sugere que, o excesso de sais do meio M1 reduz a sobrevida das células no produto. O extrato de *Camellia sinensis* adicionado no meio M2 possui compostos polifenólicos e taninos que possuem ação antioxidante (PRADO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005) e portanto, esperava-se que o mesmo atuasse como protetor das células, aumentando a sobrevida das mesmas no produto gerado, porém o resultado encontrado foi a redução da estabilidade das formulações.

4.3.2. Análise sensorial

a) Teste triangular

O teste triangular foi realizado em cabines sensoriais (Figura 4.19) do Cetal/Senai, Uberlândia, com 25 voluntários, com idades entre 16 e 49 anos, os quais foram oferecidas três amostras de dois tipos distintos de chocolate ao leite: uma não possuía adição de probióticos e a outra apresentava adição de *L. acidophilus LA-5*, provenientes de fermentação em meio M3 (Figura 4.20). As amostras foram codificadas e apresentadas de forma aleatória aos candidatos, sendo que das três amostra oferecidas, 2 eram iguais e 1 diferente, devendo o candidato escolher qual das amostras era diferente. As Figuras 4.21 e 4.22 mostram os perfis do candidatos em relação a sexo e idade.



Figura 4.19: Montagem das cabines de análise sensorial para realização do teste triangular



Figura 4.20: Amostras oferecidas aos candidatos no teste triangular

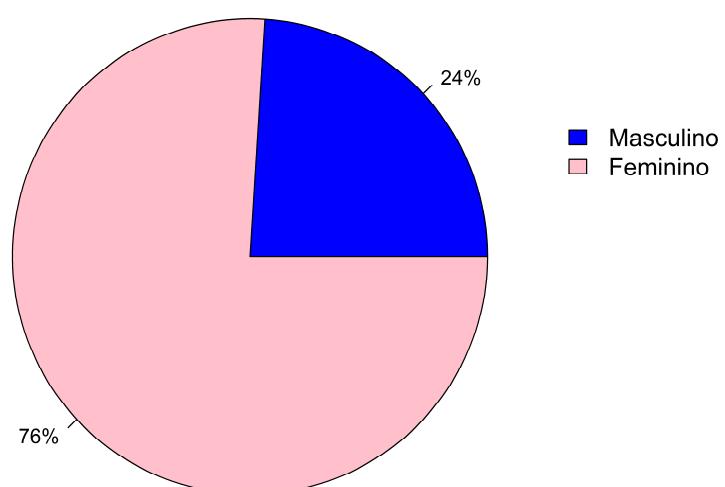


Figura 4.21: Perfil dos voluntários do teste triangular: sexo

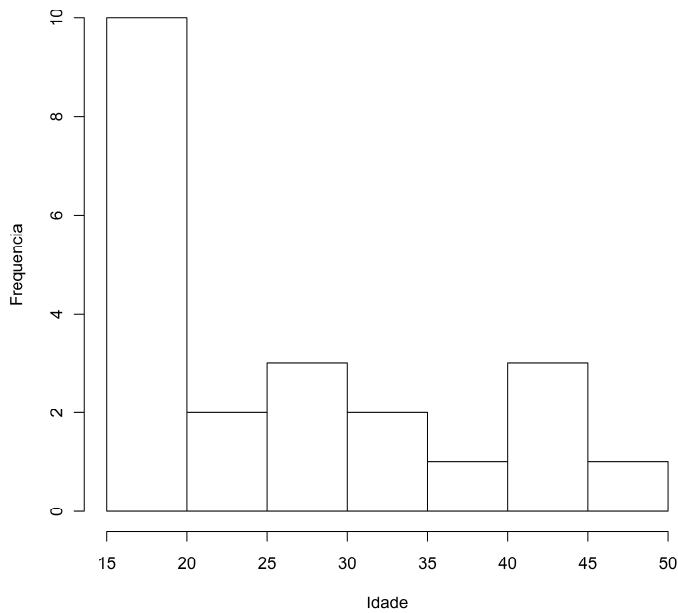


Figura 4.22: Perfil dos voluntários do teste triangular: idade

Entre os 25 voluntários avaliados, 21 deles souberam diferenciar corretamente as amostras, conforme mostrado na Figura 4.23. Este resultado indica que existe diferença entre os dois produtos testados ($p=0,5\%$), conforme verificado na Tabela 4.6 (apresentada de forma mais completa no Anexo 2) e demonstrando a necessidade de se realizar um teste afetivo que mostre o grau de gostar ou desgostar do consumidor.

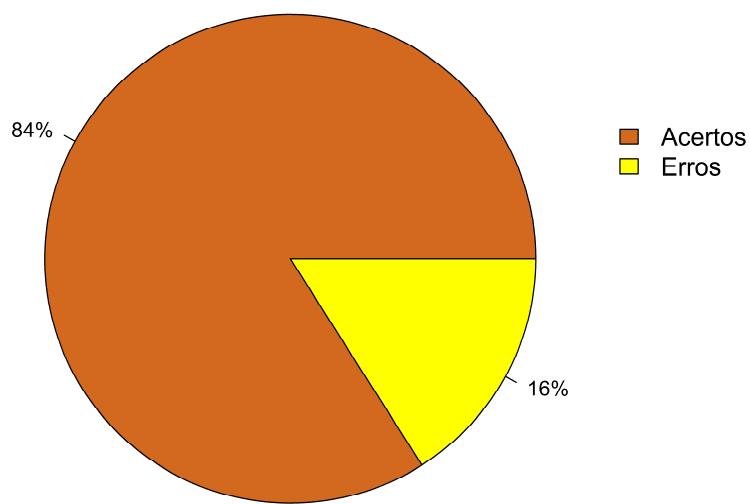


Figura 4.23: Análise Sensorial: resultado do teste triangular

Tabela 4.6: Teste triangular (unilateral, $p = 1/3$). Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância a vários níveis de probabilidade.

Nº total de julg.	Nível de probabilidade (α)						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
21	12	12	12	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	13	14	15	15	16
25	13	14	14	14	15	16	17
26	14	14	14	15	15	16	17
27	14	14	15	15	16	17	18
28	15	15	15	16	16	17	18
29	15	15	16	16	17	17	19
30	15	16	16	16	17	18	19
31	16	16	16	17	18	18	20

Nota: A tabela completa, encontra-se no Anexo 2.

b) Teste afetivo

O teste afetivo foi realizado na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e no Centro Tecnológico de Alimentos “Fábio de Araujo Motta” (CETAL/SENAI), ambos localizados na cidade de Uberlândia, com 67 alunos e funcionários voluntários, com idades entre 17 e 55 anos, aos quais foram oferecidas amostras de chocolate que continham *Lactobacillus acidophilus* LA-5, provenientes de fermentação em meio M3 (Figuras 4.24 e 4.25). Os voluntários preencheram o questionário que objetivava avaliar o grau de gostar ou desgostar do produto através de escala hedônica de 9 pontos e a intenção de compra. As Figuras 4.26 e 4.27 mostram os perfis do candidatos em relação ao sexo e a idade.



Figura 4.24: Amostras oferecidas ao candidatos no teste afetivo



Figura 4.25: Teste afetivo: degustação da amostra

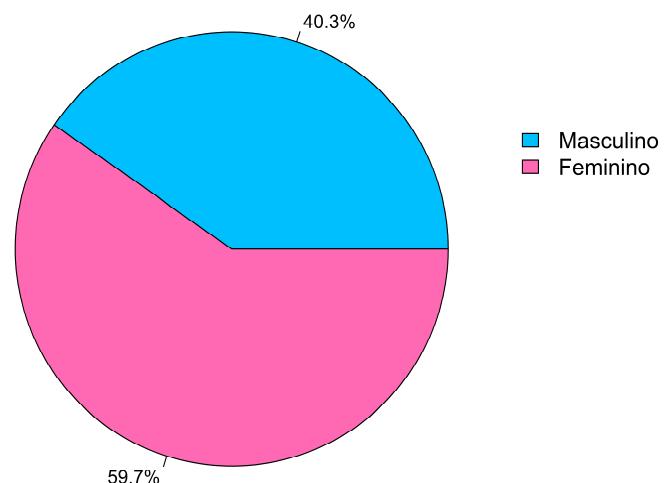


Figura 4.26: Perfil dos voluntários teste afetivo: sexo

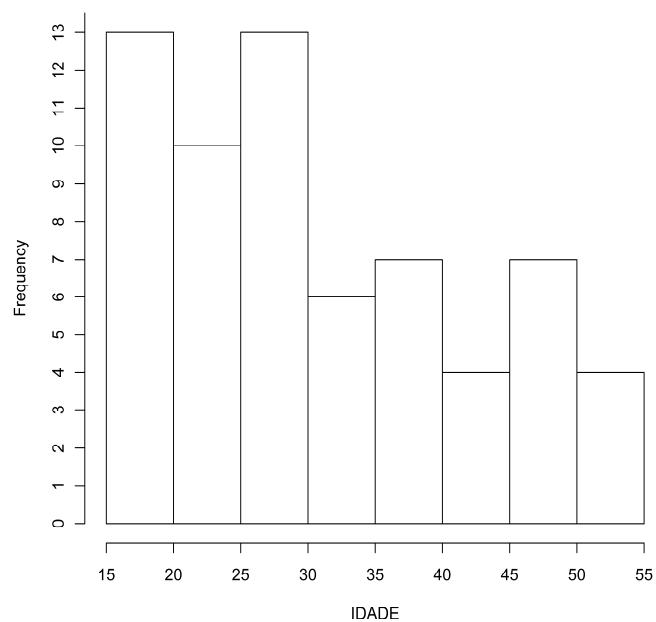


Figura 4.27: Perfil dos voluntários teste afetivo: idade

O resumo dos cálculos estatísticos associados aos resultados do teste afetivo é apresentado na Tabela 4.7 e Figuras 4.28, 4.29 e 4.30. Percebe-se que o produto apresentou grande aceitação, uma vez que dos 67 voluntários 31 (46%) gostaram moderadamente e a soma destes com os que gostaram extremamente representam 49 (73%) pessoas. Também, deve ser ressaltado que apenas um voluntário (1,5%) avaliou negativamente o produto, atribuindo a este o estado afetivo de “desgostei ligeiramente”. Em relação a intenção de compra 94% dos avaliadores disseram que comprariam o produto, o que comprova a boa aceitação do mesmo.

Tabela 4.7: Estatística descritiva da análise sensorial: teste afetivo

Sexo	Idade	Avaliação	Intenção de compra
Feminino:40	Mínima: 17 anos	Mínima: 4	Pessoas que comprariam o
Masculino: 27	Máxima: 55 anos	Máxima: 9	produto: 63
	Média: 31,5 anos	Média: 7,8	Pessoas que não comprariam o
	Mediana:30 anos	Mediana: 8	produto: 4
	1º quartil: 22 anos	1º quartil: 7	
	3º quartil: 39,25 anos	3º quartil: 9	

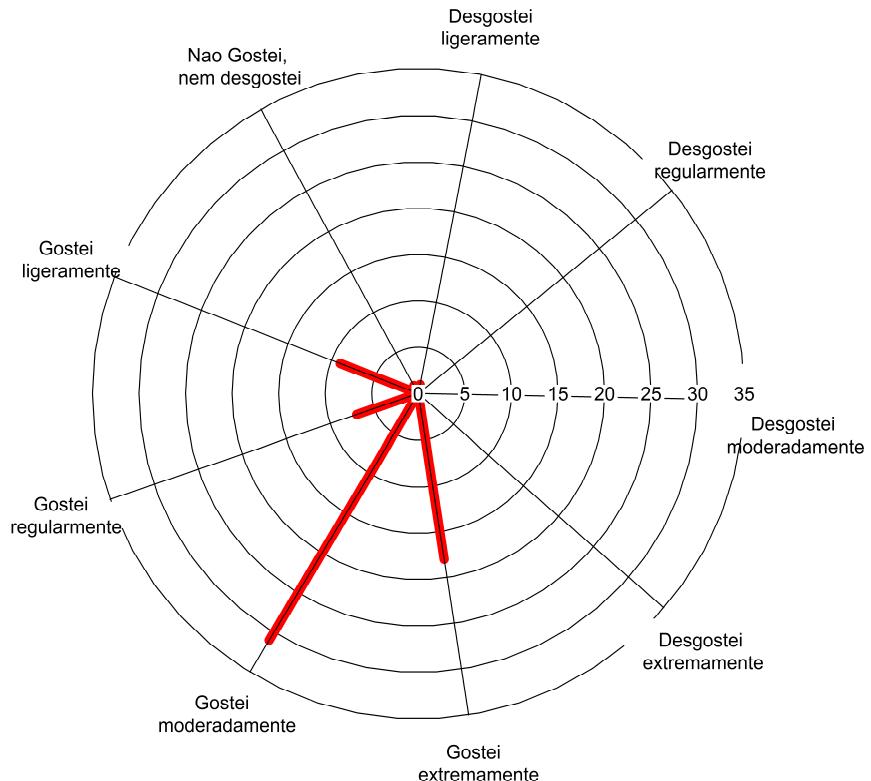


Figura 4.28: Teste afetivo: Frequência absoluta de escolha dos diferentes estados afetivos.

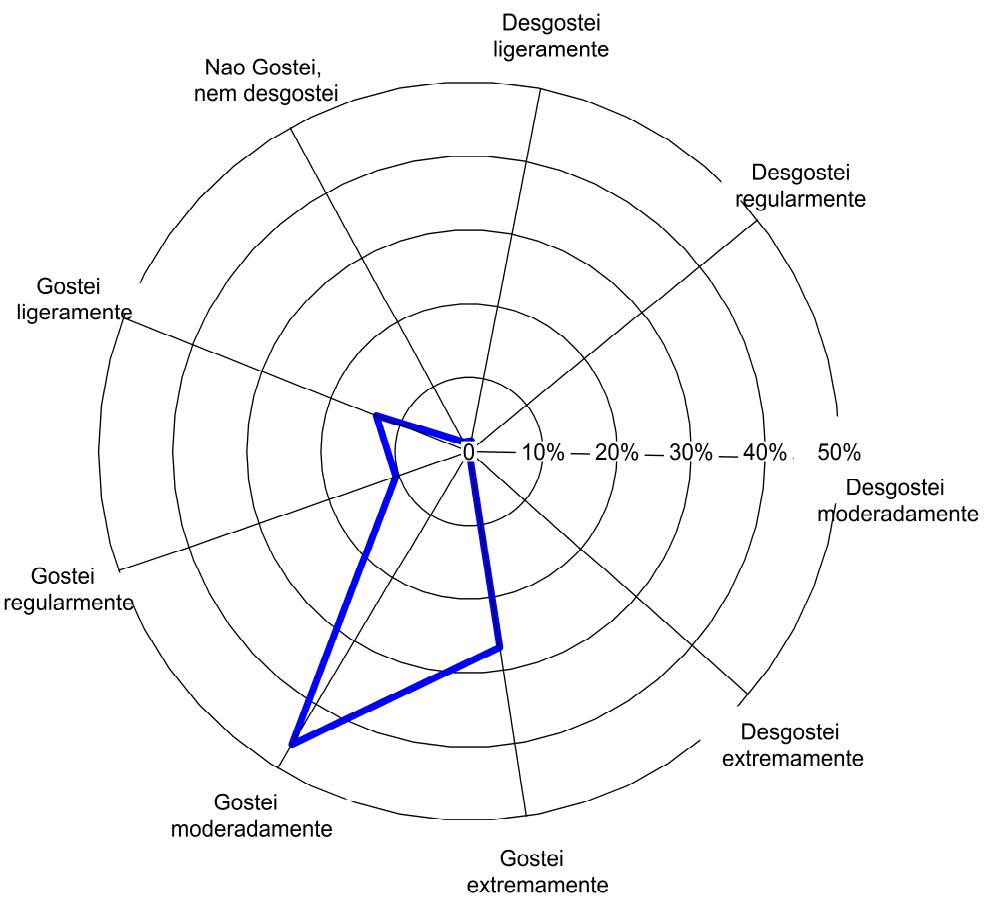


Figura 4.29: Teste afetivo: Frequência relativa de escolha dos diferentes estados afetivos

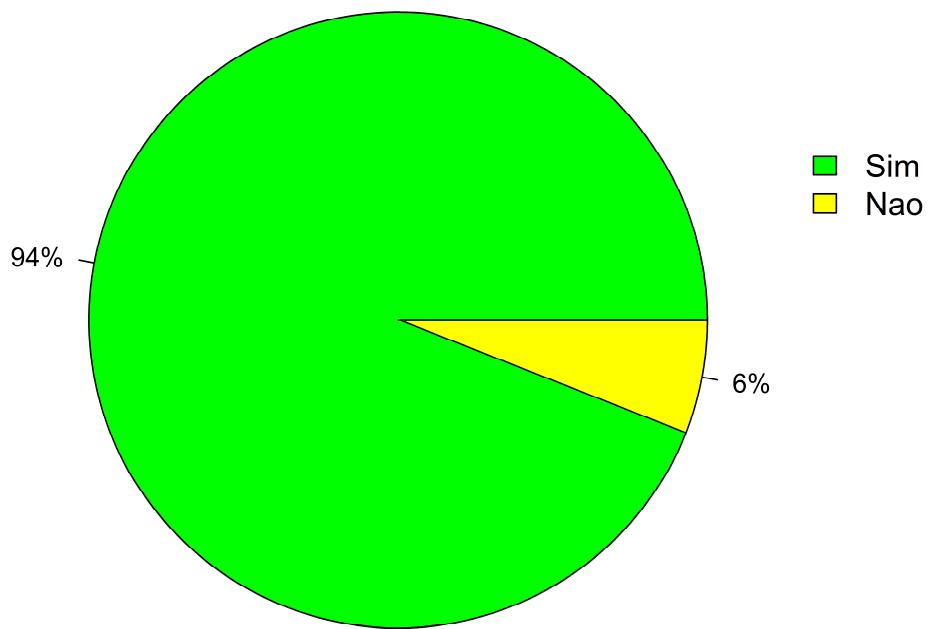


Figura 4.30: Intenção de compra obtida juntamente com o teste afetivo

Como informação adicional do teste afetivo, tem-se que 6% dos avaliadores apresentaram nas fichas opiniões referentes ao produto. A principal delas é relativa à doçura do produto degustado. Na opinião destes avaliadores, o produto tem doçura maior que o esperado para um chocolate ao leite, sugerindo a redução do teor de açúcar como possível melhoria ao produto.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

Os bombons e chocolates em barra se mostraram adequados como forma de utilização de probióticos tanto com a adição de células liofilizadas como com a adição de células fermentadas. O uso de ácido ascórbico nas condições e concentrações testadas não se aumentou a estabilidade das células no produto.

As secagem prévia das células mostrou-se capaz de aumentar a estabilidade do produto, ou seja, reduzir a cinética de morte celular sendo que dos diferentes tipos de chocolate testados todos, com e sem secagem, se mostraram adequados para o fornecimento de uma quantidade de células mínimas necessárias para que o produto seja considerado probiótico. A análise físico-química, em termos do teor de lipídeos, e atividade de água não mostraram diferenças significativas que pudesse explicar a maior estabilidade da formulação C2 em relação as demais formulações testadas, revelando apenas que os produtos gerados atendem as especificações técnicas para essas variáveis.

Os meios M1, M2 e M3 são capazes de gerar células de *L. acidophilus* LA-5 em quantidades adequadas para utilização destes na produção de formulações probióticas de chocolate. O estudo estatístico das formulações preparadas com células provenientes dos meios mostrou que a diminuição do número de células é atribuída ao envelhecimento das mesmas e do produto ao longo do tempo de estocagem, ou seja, não houve morte prematura das mesmas e não foram detectados efeitos protetivos na sobrevida das células nos diferentes meios.

Embora a geração de células nos meios M1 e M2 sejam adequados para função probiótica as células são mais estáveis no meio M3 o que sugere que o excesso de sais do meio M1 tem ação redutora na estabilidade e que a presença de taninos e antioxidantes do chá verde também geram esta ação.

O teste triangular, realizado na primeira etapa da análise sensorial, revela que existe diferença significativa ($p<0,001$) entre o produto gerado e o chocolate convencional. O teste afetivo mostrou que, apesar da diferença, o produto gerado tem alta aceitabilidade dos consumidores, com 73% das avaliações distribuídas entre os estados afetivos “gostei extremamente” e “gostei moderadamente”. Este resultado é reforçado pela análise da intenção de compra que revela que 94% dos avaliadores comprariam o produto degustado.

A Figura 5.1 apresenta uma síntese das principais conclusões.

Os diferentes tipos de formulações, barra e bombons, são adequados.

O ácido ascórbico e o extrato de *Camellia sinensis* não se mostraram eficazes no aumento da sobrevida.

Modelo de primeira ordem, em termos de valor D, foi adequado para descrever o decaimento celular ao longo do armazenamento.

Meios M1, M2 e M3 são apropriados para multiplicação celular, sendo que o M3 se destaca, gerando produto mais estável.

A análise sensorial revela que o produto gerado se difere do chocolate convencional, mas apresenta grande aceitação.

Figura 5.1: Conclusões do trabalho.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como principais contribuições para futuros trabalhos, tem-se as seguintes sugestões:

- a) Ampliação do estudo da secagem das células, buscando otimização das condições;
- b) Avaliação da estabilidade de novas cepas de micro-organismos probióticos;
- c) Avaliação da adição de novas substâncias capazes de ampliar a estabilidade das células e tempo de prateleira dos produtos gerados;
- d) Ampliação da discussão da análise de sobrevivência e modelos cinéticos que descrevem o processo de morte celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, M. M., **A cadeia global da indústria de chocolate: as transnacionais e novas formas de governança**, Informe de Pesquisa - 1997 – 2003; Belém, Pará, Brasil, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acessado em ago/2010.
- _____. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf>. Acesso em nov/2011.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I., **Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse**, LWT - Food Science and Technology Volume 40, Issue 4 , p. 669-675, 2007.
- ARAÚJO, W. M. C.; MONTEBELLO, N. P.; BOTELHO, R. B. A.; BORGO, L. A., **Alquimia dos alimentos**, vol 2, Ed. Senac - DF, Brasília, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, CACAU, AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS – ABICAB. **A história: Cacau e Chocolate**, disponível em: <http://www.abicab.org.br/index_home.htm>. Acesso em jan/2011.
- _____. **Fatos, Nutrição e Saúde**, disponível em: <http://www.abicab.org.br/index_home.htm>. Acesso em jan/2011.
- _____. **Estatísticas**, disponível em: <http://www.abicab.org.br/index_home.htm>. Acesso em jan/2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ANBT. **NBR 12806: Análise sensorial de alimentos e bebidas – Terminologia**. Rio de Janeiro, 1993.
- _____. **NBR 12995: Teste triangular em análise sensorial de alimentos e bebidas – Procedimento**. Rio de Janeiro, 1993.
- _____. **NBR 14141: Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro, 1998.
- BARRY CALLEBAUT. **Products: Chocolates**. Disponível em <<http://www.barry-callebaut.com/1468>>. Acesso em out/2010.
- BATISTA, A. P. S. A. **Chocolate: Sua história e principais características**. Tese de mestrado, Universidade de Brasília. 2008.
- BECKETT, S. T. **The Science of Chocolate**, 2nd Edition. York, UK, 2008.

- BEGUN, K.; REDDY, P. V.; LEELAJA, B. C.; RAJASHEKAR, Y.; RAJENDRAN, S., Studies on insect infestation in chocolates. *Journal of Stored Products Research*, Volume 43, p. 118-122, 2007.
- CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P., **Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria**, *FoodResearch International*, Volume 40, p. 1261–1269, 2007.
- CHAN,E.S.; ZHANG, Z., **Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in an acidic medium**, *Process Biochemistry*, Volume 40, p. 3346–3351, 2005.
- CORRÊA, S. B. M., **Desenvolvimento de manjar branco potencialmente probiótico**. Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2006.
- DAVE, R. J.; SHAH, N. P. **Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures**. *International dairy journal* , vol. 7, no 6-7, p. 435-443, 1997.
- FERRAZZANO, G.F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; NATALE, A.; POLLIO A., **Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea)**, *Fitoterapia*, Volume 80, n°5, p. 255–262 , 2009.
- FONTANA, J. A. **Water activity: Why it is important for food safety**, Decagon Devices, Inc. Pullman, Washington 99163, 1998.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B; FRIAS, J. R. G., **Tecnologia de Alimentos: Princípios e aplicações**. São Paulo, Ed. Nobel, 511 p., 2008
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. **Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapeúticos, e aplicações tecnológicas**. Boletim de Biotecnologia n° 64 p. 12-22, 1999.
- GONÇALVES, M. M., Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo quark simbiótico, Dissertação de mestrado, Viçosa, 2009.
- GRIVETTI, L. E.; SHAPIRO, H.Y. **Chocolate: History, Culture and Heritage**. Editora Wiley, 1064 p., 2009.
- GROENEVELD, J.H.; TSCHARNTKE, T.; MOSER, G.; CLOUGH, Y., **Perspectives in Plant Ecology**, *Evolution and Systematics* Volume 12, Issue 3, p. 183–191, 2010.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, São Paulo, 2008.
- KEDIA, G.; WANG, R.; PATEL, H.; PANDIELLA, S. S., **Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties**, *Process Biochemistry*, Volume 42, p. 65–70, 2007.
- KUBESH, K.; MCNEIL, N.; BELLOTTO, K., **Chocolate: In the hands of a child**. Grades 3-8, HOCPP 1045, USA, 2008.

- LEE, Y. K.; SALMINEN, S., **Handbook of probiotics and prebiotics**, 2^a ed. New Jersey, Ed. Wiley, 2009.
- LEE, E.T.; WANG, J. W., **Statistical methods for survival data analysis**, 3^aed. New Jersey, Ed. Wiley, 2003.
- LIPSKI, E., **Digestive Wellness**. 3rd ed., NY, McGraw Hill, 2004.
- MACHT, M.; DETTMER, D. **Every mood and emotions after eating a chocolate bar or an apple**. Appetite 46 Volume 46, Issue 3, p. 332-336, 2006.
- MAGALHÃES, J. T., UETANABARO, A. P. T.; MORAES, C. A., **Identification of Lactobacillus UFV H2B20 (Probiotic Strain) using DNA-DNA hybridization**. Brazilian Journal of Microbiology, Volume 39, p. 524-546, 2008.
- MENDES , F. A. T.; LIMA, E. L. **Perfil Agroindustrial do Processamento de Amêndoas de Cacau em Pequena Escala no Estado do Pará**. SEBRAE/PA, Série Perfis Empresariais , Belém, 2007.
- MENG, X. C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; DALY, C.; ROSS, R. P., **Anhydrobiotics: the challenges of drying**. Food Chemistry Food Chemistry Volume 106, Issue 4, 15 p. 1406-1416, 2008.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C., **Taninos: Uma Abordagem da Química à Ecologia**. Química Nova, Voume 28, n° 5, p. 892-896, 2005.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO – NEPA. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Unicamp, Versão 2, 2^a ed. Campinas, São Paulo, 2006
- OLIVEIRA, M. P. M., OLIVEIRA, V. L. M. I.; NAKAYAMA, V. L. T.; FREIRE, L. J., **Análise Sensorial**. 54 p., São Paulo, 2008.
- OLIVEIRA, A.F., **Análise Sensorial dos Alimentos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curso de tecnologia em alimentos, 54 p., Londrina, 2010.
- OSMAN, J. L.; SOBAL, J., **Chocolate cravings in American and Spanish individuals: Biological and cultural influences** - Appetite, Volume 47, p. 290–301, 2006
- PRADO, C. C., ALENCAR, R. G.; PAULA, T. R.; BARA, M. T. F., **Avaliação do Teor de Polifenóis da Camellia sinensis (chá verde)**. Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento, Volume 2, n°2, p. 164-167, 2005
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2011.
- RAUD, C., **Alimentos Funcionais: A nova fronteira de indústria alimentar. Análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes**. Revista de sociologia e política, volume 16, n° 31, p.85-100, nov. 2008.
- RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. **Ingredientes usados na indústria do chocolate**. Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas, vol 43 n. 3, jul./set. 2007.

RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. **Bombom para dietas especiais: avaliação química e sensorial.** Ciência e Tecnologia de alimentos, vol 27 n. 1,Campinas, 2007.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y., **Non-dairy probiotic products.** Food Microbiology, Vol. 27, p. 1–11, 2010.

SAAD, S. M. I, **Probioticos e prebióticos: o estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas, vol 42 n°1. 2006.

SHIINA, Y.; FUNABASHI, N.; LEE, K.; MURAYAMA, T.; NAKAMURA, K.; WAKATSUKI, Y.; DAIMON, M.; KOMURO, I.; **Acute effect of oral flavonoid-rich dark chocolate intake on coronary circulation, as compared with non-flavonoid white chocolate, by transthoracic Doppler echocardiography in healthy adults,** Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba City,Chiba 260-8670, Japan, 2007.

SILVA NETO, P.J.; MATOS, P. G. G.; MARTINS, A. C. S.; SILVA, A. P., **Sistema de Produção de Cacau para Amazônia Brasileira.** Belém, 125 p CEPLAC, 2001.

SOUZA, A. S. L., **Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

VINDEROLA, C. G.; GUEIMONDE, M.; DELGADO, T.; REINHEIMER, J. A.; REYES-GAVILÁN, C. G., **Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria.** International Dairy Journal, Volume 10, p. 213-220

ANEXO 1

Curvas de calibração da análise da atividade de água

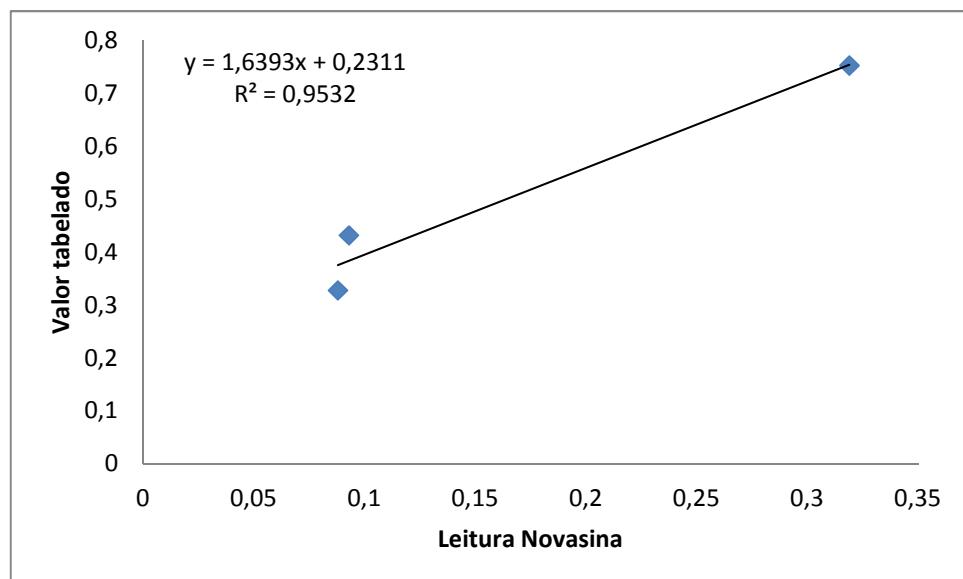


Figura F1: Curva de calibração: primeiro dia

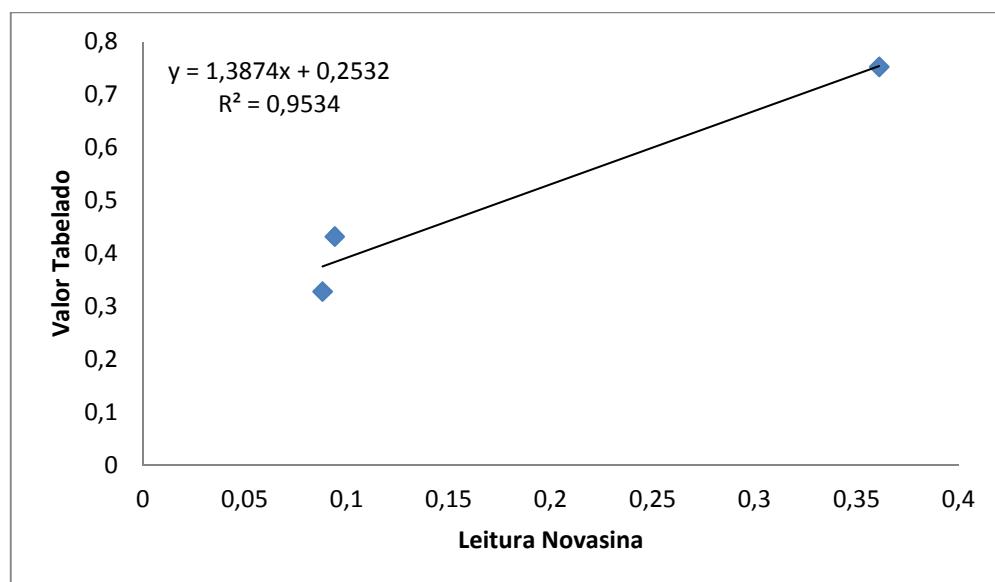


Figura F2: Curva de calibração: segundo dia

ANEXO 2

Detalhamento do tratamento de dados do teste triangular

O teste triangular é uma metodologia de análise sensorial, sendo realizado para detectar pequenas diferenças entre dois produtos distintos. Ele pode ser utilizado para avaliação global do produto ou para uma característica sensorial específica, com ou sem treinamento prévio dos julgadores. No caso de painéis de provadores treinados é preferível o método que permite ao provador declarar que não detecta diferenças entre as amostras, dado que neste caso a informação nos poderá ser útil para aferir da natureza das amostras. No caso de painéis de provadores não treinados (como por exemplo, painéis de consumidores) deve-se optar pela escolha forçada, visto que ao dar-se a oportunidade ao provador de optar por não ter de fazer uma escolha o provador poderá ter tendência a tomar esta opção que poderemos considerar como a mais “fácil”. O modo de tratar os dados dependerá do método escolhido para a recolha de dados (NORONHA, 2001).

A probabilidade de um provador escolher ao acaso a amostra diferente é de 1/3. Para saber, dado número de provadores, qual o número de respostas corretas a partir do qual podemos afirmar que existe uma diferença entre as amostras, utilizamos a distribuição Binomial.

A distribuição Binomial, considera um experimento realizado n vezes, sob as mesmas condições e com as seguintes propriedades:

- (i) Cada uma das experiências pode conduzir a apenas um de dois resultados possíveis, “sucesso” ou “insucesso”.
- (ii) A probabilidade de ocorrência de cada resultado é a mesma para todas as experiências $P(\text{sucesso}) = p = \text{constante}$, $P(\text{insucesso}) = 1-p = q$.
- (iii) Os resultados de cada experiência são independentes.

As experiências que possuem estas propriedades são conhecidas por experiências de Bernoulli.

Se X representar o número de vezes que, no decurso de N experiências de Bernoulli, ocorrem sucessos então X segue uma distribuição Binomial. A probabilidade de X tomar uma dado valor x é dada pela seguinte equação E.1:

$$p(x) = \binom{N}{x} p^x q^{N-x} = \frac{N!}{x!(N-x)!} p^x q^{N-x} \quad (\text{E.1})$$

No caso da prova triangular, a probabilidade de um “sucesso” (identificação da amostra diferente) é de 1/3 e a probabilidade de “insucesso” (não identificação da amostra) é de 2/3.

Para um experimento com 16 provadores, a substituição na equação 1 de N por 16 e x pelos valores 0, 1, 2, ...16 (0 respostas corretas a 16 respostas corretas) obtemos os valores apresentados na Tabela A.1:

Tabela A.1: Cálculo para experimento com 16 provadores

x	p(x)	Probabilidade Acumulada
0	0,00152244	0,00152244
1	0,01217951	0,01370195
2	0,04567317	0,05937511
3	0,10657072	0,16594583
4	0,17317742	0,33912325
5	0,20781290	0,54693615
6	0,19049516	0,73743131
7	0,13606797	0,87349928
8	0,07653823	0,95003752
9	0,03401699	0,98405451
10	0,01190595	0,99596046
11	0,00324708	0,99920754
12	0,00067647	0,99988401
13	0,00010407	0,99998808
14	0,00001115	0,99999923
15	0,00000074	0,99999998
16	0,00000002	1,00000000

Os dados na coluna p(x) desta tabela representam a probabilidade de obtenção de um certo número de respostas corretas no caso de p=1/3, i.e., no caso em que a probabilidade de acerto é puramente aleatória, i.e., no caso em que as amostras não apresentam diferenças.

Na terceira coluna da tabela é calculada a probabilidade de X ser menor ou igual a um dado valor de x, a probabilidade acumulada ou a Função de distribuição da variável aleatória X. Na Figura F3, são representados graficamente os dados da Tabela A.1.

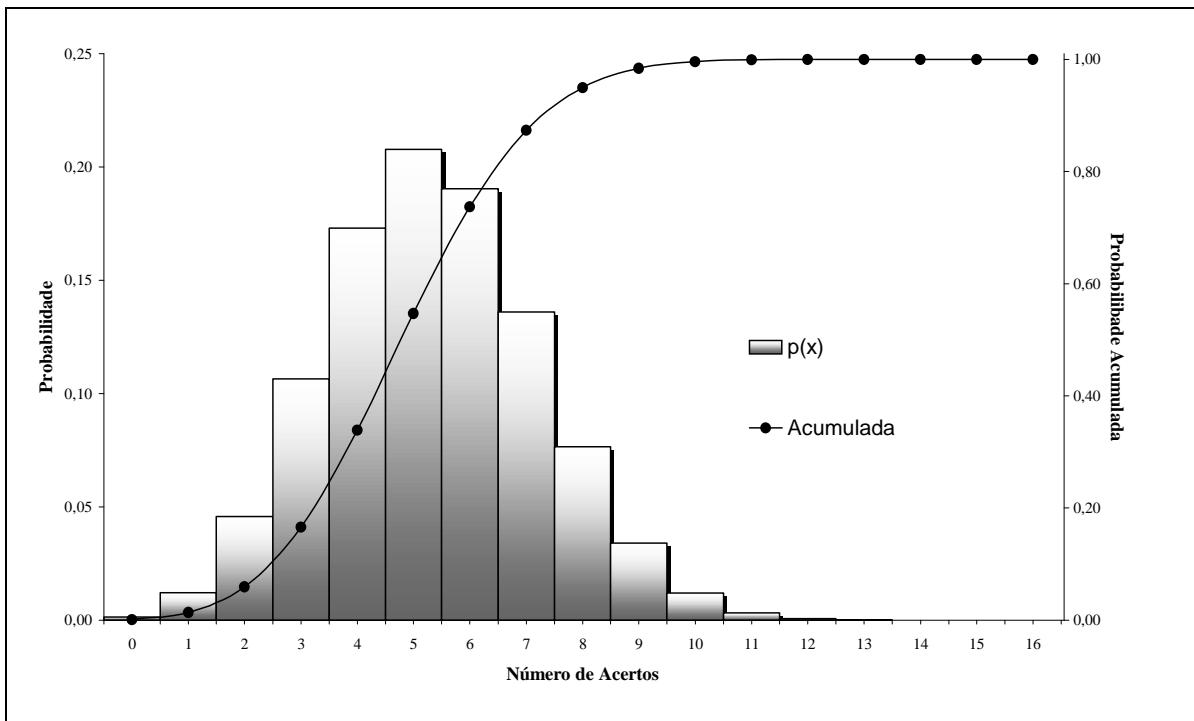


Figura F3: Representação gráfica Tabela A.1.

O procedimento básico utilizado no teste de hipóteses pode ser decomposto em quatro fases:

- (i) Definição da Hipótese
- (ii) Identificação de Estatística de teste e caracterização da distribuição amostral
- (iii) Definição da regra de decisão, com especificação do nível de significância do teste
- (iv) Cálculo da estatística de teste e tomada de decisão.

Para o caso das Provas Triangulares, definido acima:

- (i) Hipótese nula, H_0 - as amostras X e Y não apresentam diferenças
Hipótese alternativa, H_1 – as amostras X e Y apresentam diferenças
- (ii) Estatística de teste – número de respostas corretas
Distribuição amostral – Distribuição Binomial
- (iii) Regra de decisão – Número de respostas corretas acima de uma dado valor para o qual a probabilidade acumulada (segundo a distribuição Binomial) é igual ou superior a 100%-Nível de significância (α)
- (iv) Neste caso, o cálculo da estatística de teste é imediato e corresponde ao número de respostas corretas.

A tomada de decisão vai depender do nível de significância considerado.

Considerando o caso de 16 provadores, ao nível de significância para o teste de 5% e dois resultados possíveis para o teste: 7 respostas corretas em 16 e 12 respostas corretas em 16.

Consultando a Tabela A.2 verifica-se que a probabilidade, no caso de não existirem diferenças entre as amostras, do obtenção de 0 a 8 respostas corretas é de 95,003752%, logo a probabilidade de obtermos de 9 a 16 respostas corretas é de $100 - 95,003752 = 4,996248\%$, valor inferior ao nível de significância considerado. Logo, se estabelece como regra de decisão 8, i.e., se obtivermos mais de 8 (9, 10, 11, ..., 16) respostas corretas não se pode aceitar a hipótese nula, no caso contrário (0 a 8 respostas correctas) aceita-se a hipótese nula.

Nos primeiro caso considerado (7 respostas corretas em 16), não se pode rejeitar a hipótese nula e conclui-se que o painel não encontra diferenças entre as amostras. No segundo caso (12 corretas em 16), a hipótese nula é rejeitada e conclui-se que existem diferenças entre as amostra a um nível de significância de 5%.

O Instituto Adolfo Lutz apresenta a tabela de resultados para o teste triangular para um número de julgadores entre 5 e 100, para diversos níveis de significância (Tabela A.2).

Tabela A.2: Teste triangular (unilateral, $p = 1/3$). Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância a vários níveis de probabilidade.

Nº total de julgamentos	Nível de probabilidade (α)						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
5	4	5	5	5	5	5	-
6	5	5	5	5	6	6	-
7	5	6	6	6	6	7	7
8	6	6	6	6	7	7	8
9	6	7	7	7	7	8	8
10	7	7	7	7	8	8	9
11	7	7	8	8	8	9	10
12	8	8	8	8	9	9	10
13	8	8	9	9	9	10	11
14	9	9	9	9	10	10	11
15	9	9	10	10	10	11	12
16	9	10	10	10	11	11	12
17	10	10	10	11	11	12	13
18	10	11	11	11	12	12	13
19	11	11	11	12	12	13	14
20	11	11	12	12	13	13	14
21	12	12	12	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	13	14	15	15	16

Tabela A.2: Teste triangular (unilateral, $p = 1/3$). Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância a vários níveis de probabilidade. (cont.)

Nº total de julgamentos	Nível de probabilidade (α)						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
25	13	14	14	14	15	16	17
26	14	14	14	15	15	16	17
27	14	14	15	15	16	17	18
28	15	15	15	16	16	17	18
29	15	15	16	16	17	17	19
30	15	16	16	16	17	18	19
31	16	16	16	17	18	18	20
32	16	16	17	17	18	19	20
33	17	17	17	18	18	19	21
34	17	17	18	18	19	20	21
35	17	18	18	19	19	20	22
36	18	18	18	19	20	20	22
37	18	18	19	19	20	21	22
38	19	19	19	20	21	21	23
39	19	19	20	20	21	22	23
40	19	20	20	21	22	23	24
41	20	20	20	21	22	23	24
42	20	20	21	21	22	23	25
43	20	21	21	22	23	24	25
44	21	21	22	22	23	24	26
45	21	22	22	23	24	24	26
46	22	22	22	23	24	25	27
47	22	22	23	23	24	25	27
48	22	23	23	24	25	26	27
49	23	23	24	24	25	26	28
50	23	24	24	25	26	26	28
60	27	27	28	29	30	31	33
70	31	31	32	33	34	35	37
80	35	35	36	36	38	39	41
90	38	39	40	40	42	43	45
100	42	43	43	44	45	47	49

Fonte: Adolfo Lutz

A Tabela A.3, apresenta os dados experimentais do teste sensorial, juntamente com o perfil dos voluntários. Dos 25 avaliadores, 21 deles souberam diferenciar corretamente as amostras. Em consulta a Tabela A2, percebe-se que para um nível de probabilidade de até $\alpha = 0,1\%$ existe diferença entre os dois produtos testados (chocolate comercial e chocolate com probiótico).

Tabela A3: Dados experimentais do teste sensorial

Voluntário	Idade	Sexo	Avaliação
01	ND	F	Negativa
02	18	F	Negativa
03	17	F	Negativa
04	16	F	Positivo
05	18	F	Positivo
06	19	F	Positivo
07	38	F	Positivo
08	16	M	Positivo
09	29	F	Positivo
10	20	F	Positivo
11	19	F	Positivo
12	21	F	Positivo
13	20	F	Positivo
14	32	M	Positivo
15	33	M	Positivo
16	45	M	Positivo
17	44	F	Positivo
18	29	F	Positivo
19	ND	F	Positivo
20	ND	F	Positivo
21	45	F	Positivo
22	49	M	Positivo
23	25	F	Positivo
24	28	M	Negativo
25	18	F	Positivo

Nota: Positivo: identificação correta da amostra distinta.

ANEXO 3

Interpretação do resultado de aceitação por escala hedônica

Os dados coletados podem ser avaliados estatisticamente pela análise de variância, ANOVA e comparação das médias de pares de amostras pelo teste de Tukey (Tabela A.3). Se for empregada escala hedônica com comparação a um padrão de referência, será utilizado o teste de Dunnett.

Na análise da variância, a função Fc calculado é comparada com o valor de referência do teste. A forma de se calcular Fc é apresentada no Quadro 1 e o valor tabelado de Fo podem ser encontrados em livros de estatística ou calculados por softwares, como Scilab.

Quadro 1: Modelo para análise de variância (ANOVA)

FV	GL	SQ	QM	Fc
Amostra	(n – 1)	SQ _{am}	SQ _{am/n – 1}	QM _{am} / QM _{res}
Julgador	(p – 1)	SQ _{julg}	SQ _{julg / p – 1}	QM _{julg} / QM _{res}
Resíduo	(N – 1) – (n – 1) – (p – 1)	SQ _{res}	SQ _{res / N – n – p + 1}	-
Total	(N – 1)	SQ _{tot}	-	-

Fonte: Adolfo Lutz

Na qual,

FV = fontes de variação;

GL = graus de liberdade;

SQ = soma dos quadrados, dados por:

$$SQ_{am} = \{[\Sigma_{am}(A)]^2 + [\Sigma_{am}(B)]^2 + [\Sigma_{am}(C)]^2 / p\} - FC$$

$$SQ_{julg} = \{[\Sigma_{julg}(1)]^2 + [\Sigma_{julg}(2)]^2 + [\Sigma_{julg}(3)]^2 / n\} - FC$$

$$SQ_{tot} = \sum (\text{cada valor atribuído às amostras pelos julgadores})^2 - FC$$

$$SQ_{res} = SQ_{tot} - (SQ_{am} + SQ_{julg})$$

QM = quadrado médio;

Fo = valor observado de estatística “F” de Snedecor;

Fc = valor calculado, dado por:

$$FC = (\sum_{total am ou julg})^2 / N$$

$$N = n \times p$$

Nota: se Fc_{am} for maior que Fo, existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre pelo menos duas amostras codificadas.

A diferença mínima significativa, DMS, utilizando o teste de Tukey pode ser calculada com base na Equação E.2:

$$DMS = q \times \sqrt{\frac{QM_{res}}{n}} \quad (\text{E.2})$$

Na qual, QM_{res} é o quadrado médio do resíduo; n é o número de julgamentos por tratamento; q é o valor crítico tabelado a n^o de tratamentos e graus de liberdade do resíduo (Tabela A.4).

Tabela A.4: Valores de q para teste de Tukey, nível de erro $\alpha = 5\%$, segundo o número de tratamentos P e graus de liberdade do resíduo n_1

n_1	P									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
1	17,97	26,98	32,82	37,08	40,41	43,12	45,40	47,36	49,07	55,36
2	6,08	8,33	9,80	10,88	11,74	12,44	13,03	13,54	13,99	15,65
3	4,50	5,91	6,82	7,50	8,04	8,48	8,85	9,18	9,45	10,53
4	3,93	5,04	5,76	6,29	6,71	7,05	7,35	7,60	7,83	8,66
5	3,64	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99	7,72
6	3,46	4,34	4,90	5,30	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49	7,14
7	3,34	4,16	4,68	5,06	5,35	5,61	5,82	6,00	6,16	6,76
8	3,26	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92	6,48
9	3,20	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74	6,28
10	3,15	3,88	4,33	4,65	4,91	5,12	5,30	5,46	5,60	6,11
11	3,11	3,82	4,26	4,57	4,82	5,03	5,20	5,35	5,49	5,98
12	3,08	3,77	4,20	4,51	4,75	4,95	5,12	5,27	5,39	5,88
13	3,06	3,73	4,15	4,45	4,69	4,88	5,05	5,19	5,32	5,79
14	3,03	3,70	4,11	4,41	4,64	4,83	4,99	5,13	5,25	5,71
15	3,01	3,67	4,08	4,37	4,59	4,78	4,94	5,08	5,20	5,65
16	3,00	3,65	4,05	4,33	4,56	4,74	4,90	5,03	5,15	5,59
17	2,98	3,63	4,02	4,30	4,52	4,70	4,86	4,99	5,11	5,54
18	2,97	3,61	4,00	4,28	4,49	4,67	4,82	4,96	5,07	5,50
19	2,96	3,59	3,98	4,25	4,47	4,65	4,79	4,92	5,04	5,46
20	2,95	3,58	3,96	4,23	4,45	4,62	4,77	4,90	5,01	5,43
24	2,92	3,53	3,90	4,17	4,37	4,54	4,68	4,81	4,92	5,32
30	2,89	3,49	3,85	4,10	4,30	4,46	4,60	4,72	4,82	5,21
40	2,80	3,44	3,79	4,04	4,23	4,39	4,52	4,63	4,73	5,11
60	2,83	3,40	3,74	3,98	4,16	4,31	4,44	4,55	4,65	5,00
120	2,80	3,36	3,68	3,92	4,10	4,24	4,36	4,47	4,56	4,90
∞	2,77	3,31	3,63	3,86	4,03	4,17	4,29	4,39	4,47	4,80

Fonte: Adolfo Lutz

Pelo teste, duas médias são estatisticamente diferentes toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior do que a DMS.

O teste Dunnett deve ser aplicado toda vez que se pretende comparar as médias dos tratamentos apenas com a média do controle. O DMS, ao nível de significância de 5%, é calculado pela Equação E.3:

$$DMS = d \times \sqrt{\frac{2QM_{res}}{n}} \quad (\text{E.3})$$

Na qual, QM_{res} é o quadrado médio do resíduo; n é o número de repetições de cada amostra (número de julgadores); d é valor crítico para teste unilateral ou bilateral de Dunnett que pode ser encontrado de forma tabelada em livros de estatística.

As amostras que diferirem do controle codificado por uma diferença maior ou igual ao valor de DMS, são consideradas significativamente diferentes do controle ao nível de significância de 5%. O teste de Dunnett unilateral é usado quando a priori sabe-se que existe diferença entre amostras, e o teste bilateral é usado preferencialmente quando não se sabe se existe diferença entre amostras.