



Sara Vanessa Oleiro Araújo

Licenciada em Engenharia Química e Biológica

**Implementação de metodologias para a
contagem da flora específica do iogurte e de
bifidobactérias na empresa SGS Portugal, S.A.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão,
Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientadora: Engenheira Ana Machado,
Directora Técnica de Laboratório, SGS Portugal, S.A

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes, FCT-UNL

Arguente: Doutora Maria de Fátima Silva Lopes, ITQB-UNL

Vogal: Doutora Ana Lúcia Leitão, FCT-UNL



Sara Vanessa Oleiro Araújo

Licenciada em Engenharia Química e Biológica

**Implementação de metodologias para a
contagem da flora específica do iogurte e de
bifidobactérias na empresa SGS Portugal, S.A.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

“Implementação de metodologias para a contagem da flora específica do iogurte e de bifidobactérias na empresa SGS Portugal, S.A.”

COPYRIGHT© de Sara Vanessa Oleiro Araújo,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

AGRADECIMENTOS

Há anos que procuro concretizar os meus sonhos, e como sempre os vejo em horizontes longínquos, lanço-me atrás deles em desafios. Iço as velas do meu barco e deixo-o navegar pelos oceanos em direcção às conquistas.

Em consequência, e porque nada conseguiria sem eles, quero dedicar este espaço àqueles que sopraram as velas do meu barco, levando-o a um porto seguro, para carregá-lo de suprimentos necessários para mais uma grande viagem, em busca de novos horizontes. A todos, quero manifestar o meu mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar e acima de tudo, quero agradecer às pessoas mais importantes da minha vida – a minha família – por todo o apoio, compreensão e dedicação, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, e por acreditarem sempre em mim. São elas os pilares da minha existência e o que sou hoje, a elas devo.

Em segundo lugar, à professora e orientadora Ana Lúcia Leitão, docente da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, agradeço, para além de toda a partilha de conhecimentos ao longo do meu percurso académico, a total disponibilidade, a motivação, os conselhos e o carinho prestados, e por continuar a incentivar-me a chegar ainda mais longe.

Quero também agradecer à empresa SGS Portugal, S.A. por ter disponibilizado materiais e equipamentos para a realização da presente dissertação, em especial à Engenheira Ana Machado e à equipa do laboratório de microbiologia, pela forma como me acolheram e pela partilha de conhecimento e experiência necessárias para a minha realização pessoal e profissional.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus amigos que, de uma maneira ou de outra, estando longe ou perto, me acompanham, apoiam e incentivam, não só no desenvolvimento desta dissertação, mas ao longo da minha vida. Obrigada por toda a força, afecto e companheirismo e pela partilha de bons momentos.

Por fim, mas não menos importante, quero deixar um agradecimento especial aos meus companheiros de estimação, pelo amor verdadeiro e por serem uma fonte inesgotável de alegria e sorrisos.

A todos aqueles que contribuíram para que eu alcançasse esta tão importante e desejada meta na minha vida, um sincero

Muito obrigada!

RESUMO

É do conhecimento geral que a população portuguesa está cada vez mais preocupada com a sua saúde e qualidade de vida, bem como em mudar alguns dos seus hábitos alimentares. Consequentemente, a procura por alimentos que proporcionam, para além de boas propriedades organolépticas e nutritivas, benefícios à saúde do consumidor, aumentou significativamente nas últimas décadas, onde os produtos lácteos fermentados surgem em grande destaque.

Vários são os microrganismos empregues no desenvolvimento de produtos lácteos fermentados. Na produção de iogurtes, são utilizadas culturas lácteas tradicionais (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), também denominadas por flora específica do iogurte, e/ou bactérias probióticas, como as bifidobactérias, devido às suas boas características tecnológicas, terapêuticas e sensoriais.

O trabalho descrito nesta dissertação de mestrado foca-se na validação e implementação de metodologias que permitem a contagem da flora específica do iogurte e de bifidobactérias, em iogurtes, na empresa SGS Portugal, S.A.

A enumeração da flora específica do iogurte teve como base a norma ISO 7889:2003, por meio da técnica de sementeira por incorporação no meio de cultura apropriado e posterior contagem em placa dos microrganismos presentes. Foram analisadas 20 amostras de iogurtes, obtendo-se valores de contagens da flora específica do iogurte na ordem de 10^8 UFC/g de produto, indo ao encontro dos valores estabelecidos pela legislação portuguesa em vigor.

A enumeração de bifidobactérias teve como base a norma ISO 29981:2010, por meio da técnica de sementeira por incorporação no meio de cultura apropriado e posterior contagem em placa dos microrganismos presentes. Das 20 amostras de iogurtes probióticos analisadas, apenas 15 obtiveram resultados positivos, apresentando valores de contagens de bifidobactérias superiores a 10^6 UFC/g de produto. Estas amostras, para além de apresentarem valores de acordo com os valores estabelecidos pela legislação portuguesa em vigor, são terapêuticamente eficazes, durante todo o prazo de validade do produto, uma vez que apresentam valores de contagem de bactérias probióticas superiores a 10^6 UFC/g, sendo este o padrão mínimo necessário para que um iogurte seja considerado como probiótico.

Com base nos resultados obtidos e no cumprimento dos parâmetros preconizados nos procedimentos de validação de métodos microbiológicos, foi possível a validação destas metodologias e as suas implementações na empresa SGS Portugal, S.A.

Palavras-chave: iogurte, Flora específica do iogurte, Probióticos, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, Bifidobactérias

ABSTRACT

The Portuguese population is increasingly concerned about their health and quality of life, as well as the change of some of their eating habits. Consequently, the demand for foods that provide not only good organoleptic and nutritional properties, but benefits to consumer's health, has increased significantly in the recent decades, where fermented milk products came in great prominence.

Several microorganisms are employed in the development of fermented dairy products. Traditional dairy cultures are used in the production of yogurts (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*), also called yogurt's specific flora. Probiotic bacteria such as bifidobacteria can also be used due to their good technological, therapeutic and sensory characteristics.

The work described in this master's thesis is focused on the validation and implementation of methodologies that allow the counting of yogurt's specific flora and bifidobacteria in yogurts, at SGS Portugal, S.A.

The enumeration of yogurt's specific flora was based on ISO 7889:2003, through the incorporation in the appropriate medium and further plate counting of the microorganisms present. 20 samples of yogurt were analyzed, giving values of yogurt's specific flora counts greater than 10^8 CFU/g of product, meeting the values established by the Portuguese legislation.

The bifidobacteria enumeration was based on ISO 29981:2010, by incorporating in the appropriate medium and further plate counting of the present microorganisms. From the 20 samples of probiotic yogurt analyzed, only 15 were positive, with bifidobacteria count values on the order of 10^6 CFU/g of product. These samples, far more than presenting values according to the ones established by the Portuguese legislation, are therapeutically effective for the entire shelf life of the product, since they have probiotic bacteria counts greater than 10^6 CFU/g, which it is the minimum standard required for a yogurt to be considered as probiotic.

Based on the obtained results and in the fulfillment of validation parameters for microbiological methods, it was possible to validate these methodologies and their implementation in the company SGS Portugal, S.A

Keywords: Yogurt, Yogurt's Specific Flora, Probiotics, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, Bifidobacterias

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
1. ABORDAGEM INTRODUTÓRIA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Alimentos funcionais	3
2.2. O iogurte.....	5
2.2.1. História.....	5
2.2.2. Definição e classificação	6
2.2.3. Processo geral de fabrico.....	7
2.2.4. Composição nutricional	9
2.2.4. Culturas Lácteas.....	11
2.2.4.1. Flora específica	11
2.2.4.2. Probióticos	13
2.2.4.2.1. Bifidobactérias.....	16
2.2.5. Consumo em Portugal	18
2.2.6. Consumo mundial.....	20
3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA.....	21
4. METODOLOGIA	23
4.1. Amostragem	23
4.2. Diluente	24
4.3. Meios de cultura e Suplementos	24
4.3.1. Meio MRS Agar	24
4.3.2. Meio M17 Agar	24
4.3.2.1. Solução de Lactose 10%.....	25
4.3.3. Meio TOS Agar	25
4.3.3.1. Solução MUP	25
4.4. Procedimento Experimental	26
4.4.1. Preparação da diluição primária.....	26
4.4.2. Preparação das diluições decimais.....	26
4.4.3. Inoculação e Incubação.....	27

4.4.3.1.	Controlo da qualidade do meio de cultura.....	27
4.4.3.2.	Inóculo e incubação para contagem de <i>S. thermophilus</i>	27
4.4.3.3.	Inóculo e incubação para contagem de <i>L. bulgaricus</i>	27
4.4.3.4.	Inóculo e incubação para contagem de bifidobactérias.....	28
4.5.	Testes de Confirmação.....	28
4.6.	Cálculo das contagens da flora específica e de bifidobactérias.....	29
4.6.1.	Cálculo da contagem da flora específica.....	29
4.6.2.	Cálculo da contagem de bifidobactérias.....	30
4.7.	Validação da Metodologia.....	30
4.7.1.	Ensaio Intralaboratorial – Controlo de Qualidade Interno.....	32
4.7.1.1.	Critério de Precisão – Carta de Duplicados.....	32
4.7.1.2.	Estimativa da Incerteza.....	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1.	Contagem de colónias.....	36
5.1.1.	Contagem de <i>S. thermophilus</i>	36
5.1.2.	Contagem de <i>L. bulgaricus</i>	36
5.1.3.	Contagem de bifidobactérias.....	37
5.2.	Resultados dos Testes de Confirmação.....	37
5.2.1.	Resultado do teste do hidróxido de potássio.....	37
5.2.2.	Resultado do teste da catalase.....	38
5.3.	Resultados das contagens da flora específica e discussão.....	39
5.4.	Resultados das contagens das bifidobactérias e discussão.....	44
5.5.	Cálculo de Critério de Precisão.....	47
5.5.1.	Flora Específica.....	47
5.5.2.	Bifidobactérias.....	49
5.6.	Cálculo da Estimativa da Incerteza.....	51
5.6.1.	Flora Específica.....	51
5.6.2.	Bifidobactérias.....	52
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	55
7.	BIBLIOGRAFIA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Diagrama geral de produção de iogurte sólido, batido e líquido (adaptado de Kardel e Antunes, 1997).	7
Figura 2.2: Visualização microscópica de colónias de (a) <i>S. thermophilus</i> e (b) <i>L. bulgaricus</i> no iogurte. Barra corresponde a 2 µm (adaptado de Tamime, 2006)	11
Figura 2.3: Visualização microscópica de colónias de <i>Bifidobacterium</i> spp. Barra corresponde a 1 µm (adaptado de Biavati <i>et al.</i> , 2000)	16
Figura 2.4: Evolução do consumo humano (kg/habitante/ano) de leites fermentados (incluindo iogurtes) da população portuguesa, no período de 1983 a 2013.	19
Figura 2.5: Consumo humano de iogurtes em 15 países do mundo, expressos em c./p./a. (copos/pessoa/ano), no ano de 2013 (adaptado de Danone, 2015).	20
Figura 3.1: Logotipo e slogan da SGS, S.A. (adaptado de SGS, 2015)	21
Figura 4.1: Diluições decimais de uma cultura microbiana a partir de uma suspensão inicial.	26
Figura 5.1: Da esquerda para a direita apresentam-se as placas de meio M17 contendo colónias de <i>S. thermophilus</i> , após incubação, correspondentes às diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}	36
Figura 5.2: Da esquerda para a direita apresentam-se as placas de meio MRS, correspondentes às diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , contendo colónias de <i>L. bulgaricus</i> , após incubação.	36
Figura 5.4: Teste de hidróxido de potássio: mistura de uma colónia de um microrganismo característico da flora específica do iogurte com uma solução de KOH a 3%.	37
Figura 5.3: Da esquerda para a direita apresentam-se as placas de meio TOS-MUP contendo colónias de bifidobactérias, após incubação, correspondentes às diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}	37
Figura 5.5: Teste da catalase: mistura de uma colónia de um microrganismo característico da flora específica do iogurte com uma solução de peróxido de hidrogénio a 3%.	38
Figura 5.6: Carta de Duplicados correspondente às contagens de microrganismos característicos da flora específica do iogurte, em 20 amostras de iogurtes, sendo CP o critério de precisão e R Log a amplitude dos logaritmos dos duplicados.	48
Figura 5.7: Carta de Duplicados correspondente às contagens de bifidobactérias, em 15 amostras de iogurtes, sendo CP o critério de precisão e R Log a amplitude dos logaritmos dos duplicados.	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Principais classes de ingredientes funcionais, exemplos e respectivos benefícios para a saúde (adaptado de Lidon e Silvestre, 2010; Martins <i>et al.</i> , 2004).....	4
Tabela 2.2: Classificação do iogurte em função da sua consistência, da sua composição e aromatização, e da matéria gorda (adaptado de Portaria nº 742/92).	6
Tabela 2.3: Composição nutricional de diferentes tipos de iogurtes, por 100 g de parte edível (adaptado de INSA, 2015)	10
Tabela 2.4: Microrganismos com propriedades probióticas (adaptado de Holzapfel <i>et al.</i> , 2001).	14
Tabela 2.5: Espécies de probióticos, dosagens e regime recomendados para algumas indicações clínicas (adaptado de Williams, 2010).....	15
Tabela 2.6: Consumo humano <i>per capita</i> (kg/habitante) de leites fermentados (incluindo iogurtes), da população portuguesa, no período de 1983 a 2013 (adaptado de INE, 2015).....	18
Tabela 5.1: Resultados obtidos nas contagens de <i>S. thermophilus</i> ($N_{S. thermophilus}$) e de <i>L. bulgaricus</i> ($N_{L. bulgaricus}$) nas diluições de 10^{-5} a 10^{-8} , e da flora específica do iogurte (N_{Flora}), em 20 amostras de iogurtes, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g).....	39
Tabela 5.2: Resultados obtidos nas contagens de bifidobactérias, nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , em 20 amostras de iogurtes, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g).....	44
Tabela 5.3: Cálculo do Critério de Precisão (CP), para a flora específica do iogurte, com base no Guia OGC00XX (IPAC, 2015).....	47
Tabela 5.4: Cálculo do Critério de Precisão (CP), para as bifidobactérias, com base no Guia OGC00XX (IPAC, 2015).....	49
Tabela 5.5: Cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade (S_R), do limite de reprodutibilidade (R) e da Incerteza Expandida (U), expressos em Log_{10} (UFC/g), para a flora específica do iogurte, com base no Guia OGC005 (IPAC, 2006).....	51
Tabela 5.6: Cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade (S_R), do limite de reprodutibilidade (R) e da Incerteza Expandida (U), expressos em Log_{10} (UFC/g), para as bifidobactérias, com base no Guia OGC005 (IPAC, 2006).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

A.O.A.C	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APN	Associação Portuguesa dos Nutricionistas
BPW	<i>Buffered peptone water</i>
c./p./a.	Copo/pessoa/ano
CO₂	Dióxido de carbono
CP	Critério de precisão
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DPH	Detergentes, produtos de higiene e cosméticos
Eurostat	Estatísticas da União Europeia
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FOSHU	<i>Food for Specified Health Use</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
INE	Instituto Nacional de Estatística
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISO	<i>Internacional Organization for Standardization</i>
KOH	Hidróxido de Potássio
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
LBA	<i>Laked Blood Agar</i>
MRS	<i>De Man, Rogosa e Sharpe</i>
MUP	<i>Mupirocin Lithium Salt</i>
NP	Norma Portuguesa
O₂	Oxigénio
pH	Potencial de hidrogénio
PIQ	Padrões de Identidade e Qualidade
R	Limite de reprodutibilidade
rpm	Rotações por minuto
S.A.	Sociedade Anónima
SGS	<i>Société Générale de Surveillance</i>
S_R	Desvio padrão da reprodutibilidade
TOS	<i>Transgalactosylated Oligosaccharide</i>
U	Incerteza Expandida
UFC	Unidade Formadora de Colónias
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

1. ABORDAGEM INTRODUTÓRIA

A crescente preocupação com a saúde e a qualidade de vida, levou a população a procurar novos alimentos que proporcionam, além de boas propriedades organolépticas e nutritivas, benefícios à saúde do consumidor. Estes alimentos, denominados como alimentos funcionais, despertam o interesse na investigação e no desenvolvimento de novos produtos alimentícios, onde os produtos lácteos surgem em grande destaque.

Os produtos lácteos fermentados, produzidos por bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) tradicionais e/ou bifidobactérias, têm sido considerados como alimentos benéficos para a saúde, aumentando, conseqüentemente, a sua popularidade nas últimas décadas.

A elaboração do presente trabalho visa fundamentalmente a implementação e validação das metodologias ISO 7889:2003 e 29981:2010, na empresa SGS Portugal, S.A.

A ISO 7889:2003 descreve uma metodologia para a contagem de bactérias da flora específica do iogurte, através do método de sementeira por incorporação em placas de Petri contendo os meios de cultura apropriados e incubação a 37 °C. Posteriormente, realiza-se a contagem dos microrganismos presentes e os testes de confirmação (teste de hidróxido de potássio e de catalase). Este método é aplicável em iogurtes, onde ambos os microrganismos característicos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) estão presentes na forma de células viáveis.

Por outro lado, a ISO 29981:2010 descreve um método para a contagem selectiva de bifidobactérias em produtos lácteos, através da técnica de sementeira por incorporação em placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado e incubação a 37 °C, em condições de anaerobiose. Posteriormente, realiza-se a contagem dos microrganismos presentes. O método é aplicável em produtos lácteos, onde estes microrganismos estão presentes na forma de células viáveis, e em combinação com outras bactérias lácteas.

Desta forma, o presente trabalho teve como objectivos:

- Enumeração da flora específica do iogurte, em iogurtes, a partir da norma ISO 7889:2003 e comparação com a norma portuguesa NP 1864, método actualmente utilizado pela empresa SGS Portugal, S.A.;
- Enumeração de bifidobactérias, em iogurtes, a partir da norma ISO 29981:2010;
- Avaliação dos resultados obtidos e comparação com a legislação em vigor e a literatura internacional;
- Validação das metodologias ISO 7889:2003 e 29981:2010, com base nos Guias OGC005 e OGC00X do Instituto Português de Acreditação (IPAC).

Esta dissertação encontra-se dividida em seis capítulos, onde são desenvolvidos todos os temas necessários à sua compreensão:

No primeiro capítulo – **Abordagem Introdutória** – é feita uma pequena introdução a todo o trabalho, onde é apresentado um enquadramento ao tema proposto, os seus objectivos e a descrição da organização estrutural do mesmo.

No segundo capítulo – **Revisão Bibliográfica** – são abordados fundamentos teóricos referentes aos temas estudados durante o desenvolvimento do trabalho, tendo como principal destaque o iogurte (definição e classificação; composição nutricional; processo geral de fabrico; bactérias lácteas utilizadas; benefícios para a saúde; consumo em Portugal e no mundo, entre outros assuntos).

No terceiro capítulo – **Caracterização da Empresa** – é feita uma abordagem à empresa SGS Portugal, S.A., na qual foi realizado o estágio curricular, apresentando alguns dados históricos e o sector de actividade.

O quarto capítulo – **Metodologia** – contempla a parte experimental do trabalho realizado, tendo por base as metodologias que permitiram a implementação e validação dos métodos em questão. É feita também uma introdução aos requisitos necessários para a implementação e validação dos métodos em estudo na empresa SGS Portugal, S.A.

No quinto capítulo – **Resultados e Discussão** – são apresentados, tratados e discutidos os resultados experimentais.

Por último, no sexto capítulo – **Conclusão e Perspectivas Futuras** – são apresentadas de forma sucinta, as principais conclusões subjacentes ao estudo efectuado, assim como os obstáculos decorrentes desse estudo e são feitas sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nas últimas décadas, a preocupação crescente com a saúde e com a qualidade de vida levou a população a fazer exercício físico regular, a insistir com uma alimentação mais saudável e a diminuir o consumo de alimentos ricos em açúcar, sal e gordura.

Consequentemente, houve um aumento na procura por alimentos com alguma propriedade funcional. Neste contexto, ganham interesse os alimentos denominados como alimentos funcionais, dentre os quais, o iogurte surge em grande destaque.

2.1. Alimentos funcionais

O conceito de alimentos funcionais surgiu inicialmente no Japão, na década de 80, através da publicação de uma regulamentação do governo, cujo objectivo era desenvolver alimentos saudáveis para uma população numerosa e que apresentava uma elevada esperança média de vida. Nesta publicação, os alimentos funcionais eram definidos como “alimentos processados que contêm substâncias ou nutrientes que desempenham uma acção específica nas funções fisiológicas do organismo humano, para além do seu conteúdo nutricional”. Em 1991, foram lançados os primeiros produtos funcionais, no Japão, criando uma nova categoria de alimentos designada FOSHU (*Foods for Specified Health Use*), com o propósito de reduzir os custos crescentes no sector da saúde (Hasler, 2002).

Apesar de ainda não existir uma definição oficial para o conceito de alimento funcional, alguns autores descrevem-no como sendo um alimento ou ingrediente que produz efeitos metabólicos e fisiológicos benéficos para a saúde e/ou reduz o risco do desenvolvimento de doenças crónicas, para além da sua função nutricional básica. O ingrediente funcional tem que permanecer no alimento e demonstrar os seus efeitos nas quantidades em que é ingerido na dieta, e deve ser consumido regularmente, como parte de uma dieta variada (ILSI, 2015; Lidon e Silvestre, 2010; Verschuren, 2002; Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001).

Os alimentos funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à sua origem (vegetal ou animal) ou quanto aos seus benefícios na saúde humana (Souza *et al.*, 2003), sendo estes (Martins *et al.*, 2004):

- Redução do risco de desenvolvimento de doenças crónicas, como o cancro, osteoporose e hipertensão;
- Melhoria da saúde óssea e gastrointestinal;
- Atraso no processo de envelhecimento;
- Reforço do sistema imunitário;
- Melhoria de estados depressivos e da qualidade do sono;
- Aumento dos níveis de energia e melhoria da *performance* dos atletas.

Este conceito engloba alimentos que são constituídos por nutrientes e/ou microrganismos benéficos para a saúde, tais como carotenóides, polifenóis, flavenóides, proteínas de soja, fibras solúveis e insolúveis, ácidos gordos ómega-3, pigmentos antioxidantes, esteróis vegetais, probióticos, prebióticos, entre outros (Lidon e Silvestre, 2010). A tabela 2.1 apresenta as principais classes de ingredientes funcionais, bem como alguns exemplos e os benefícios para a saúde que lhes são atribuídos.

Tabela 2.1: Principais classes de ingredientes funcionais, exemplos e respectivos benefícios para a saúde (adaptado de Lidon e Silvestre, 2010; Martins *et al.*, 2004).

Ingredientes	Exemplos	Benefícios para a saúde
Vitaminas	Ácido fólico, B ₆ , B ₁₂ , D e K	Reduzem o risco de doenças cardiovasculares e de osteoporose.
Minerais	Cálcio e magnésio	Reduzem o risco de osteoporose; Fortalecem o sistema imunitário.
Antioxidantes	Tocoferóis (vit. E), ácido ascórbico (vit. C), carotenóides, flavonóides e polifenóis	Reduzem o risco de arteriosclerose, do desenvolvimento de cancro e de lesões oxidativas do ADN; Possuem acção anti-inflamatória.
Proteínas, péptidos e aminoácidos	Péptidos das proteínas do leite	Reduzem a pressão arterial; Influenciam funções físicas e cognitivas; Possuem acção antibacteriana.
Ácidos gordos	Ómega-3 e ómega 6	Reduzem o risco de doenças cardiovasculares e de desenvolvimento de cancro; Indispensáveis para o desenvolvimento do cérebro.
Fitoquímicos	Fitosteróis, β-glucanos e isoflavonas	Reduzem o colesterol e os riscos de doenças cardiovasculares e a osteoporose; Possuem acção anticancerígena; Podem regular doenças relacionadas com hormonas.
Probióticos	Bactérias ácido lácticas	Melhoram a microflora intestinal; Reduzem a diarreia e a obstipação; Fortalecem o sistema imunitário; Reduzem o colesterol, as doenças do cólon e o risco de desenvolvimento de cancro.
Prebióticos	Fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos, inulina, amido resistente e pectinas	Ajudam o crescimento de microrganismos probióticos e/ou a sua acção no sistema digestivo; Aumentam a absorção de cálcio e magnésio.

Os alimentos funcionais já começam a obter um nível de popularidade significativo junto dos consumidores. Na Europa, os principais alimentos funcionais são os lacticínios, com uma quota de mercado de 46%, seguindo-se os alimentos contendo cereais, com uma quota de 28%. Nos Estados Unidos e no Japão encontram-se as bebidas funcionais, com a maior quota de mercado (cerca de 60%), seguidas de produtos com cereais (Estados Unidos, 17%) e produtos de confeitaria (Japão, 15%) (Martins *et al.*, 2004).

2.2. O iogurte

2.2.1. História

A história do iogurte é antiga e leva a querer que começou no Médio Oriente, o que explica a origem do próprio nome “jugurt”. Porém, o iogurte recebe diferentes designações de acordo com as regiões do mundo, como na Bulgária, onde a sua importância é muito significativa na dieta, e é chamado de “yaourt” (Salado e Andrade, 1989).

Em regiões de deserto, onde havia domesticação de gado, parte do leite era armazenado em marmitas de barro. As temperaturas elevadas favoreciam o desenvolvimento de microrganismos lácteos, naturalmente presentes no leite, cujo metabolismo promove a coagulação do leite, através da fermentação da lactose (Tamime, 2006).

Há mais de cem anos que são estudados os efeitos benéficos para a saúde conferidos por leites fermentados e iogurtes. O marco destes estudos foi a “Teoria da Longevidade” elaborada por um biólogo russo e naturalizado francês chamado Elie Metchnikoff (1845 - 1916), que, em 1907, documentou as suas observações sobre a elevada esperança média de vida e bom estado de saúde de povos búlgaros e a possibilidade de tais observações estarem associadas ao elevado consumo de produtos lácteos fermentados, ricos em bactérias produtoras de ácido láctico. Metchnikoff aprofundou então os seus estudos e conseguiu isolar um bacilo do iogurte, baptizando-o de *Bacillus bulgaricus*, que, por muito tempo, foi considerado o que hoje se conhece por *Lactobacillus bulgaricus*. Anos mais tarde, verificou-se que o microrganismo contido naqueles produtos era o *Lactobacillus acidophilus*, devido à sua afinidade com o tracto intestinal humano. Em 1908, Metchnikoff ganhou prémio Nobel da Medicina devido à sua teoria, a qual acabou por estimular extensivos estudos sobre o assunto e criou o conceito de culturas probióticas (Metchnikoff, 1907; Tamime, 2006).

Os primeiros iogurtes comerciais foram produzidos em 1920 na França e Espanha e em 1940 nos Estados Unidos. Contudo, só após a Segunda Guerra Mundial, os leites fermentados passaram a ser produzidos em escala industrial e, a partir de 1960, observou-se um aumento do consumo deste produto, devido a melhorias nas técnicas de processamento, principalmente a partir da inserção de vários sabores aos produtos, na qualidade nutritiva e na função terapêutica (Tamime, 2006).

Desde então, a maioria dos iogurtes tem sido produzida em condições controladas e com culturas microbianas específicas. Com o avanço científico-tecnológico, a produção industrial intensificou-se e as melhorias de processo, como a selecção de culturas puras de bactérias lácteas e a construção de reactores especificamente para a fermentação e tratamento térmico do leite, foram responsáveis por aumentar a qualidade deste produto alimentício (Saboya *et al.*, 1997; Tamime, 2006).

A fermentação do leite é feita em muitos países no mundo, por diferentes métodos, resultando em vários produtos de leite fermentado, sendo o iogurte o mais comum e também o mais consumido.

Os produtos variam, consideravelmente, em composição, *flavour* (conceito de análise sensorial que engloba os fenómenos gosto, aroma e sabor) e textura, de acordo com a natureza dos microrganismos fermentadores, do tipo de leite e do processo usado na fabricação (Deeth e Tamime, 1981).

2.2.2. Definição e classificação

Em Portugal, segundo a portaria nº 742/92 de 24 de Julho, o iogurte é definido como um produto coagulado obtido por fermentação láctica devido à acção exclusiva de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre o leite ou produtos lácteos (leite pasteurizado, leite pasteurizado parcialmente desnatado, leite pasteurizado desnatado ou nata pasteurizada), com ou sem a adição de leite em pó ou derivados, açúcares e edulcorantes (Portaria nº 742/92), devendo a flora específica estar viva e abundante no produto final (igual ou superior a 10^7 UFC/g) (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001; Portaria nº 742/92).

Actualmente, existem vários tipos de iogurtes no mercado, que se diferenciam quanto ao seu sabor, aroma, consistência, ingredientes, valor calórico, teor de gordura, processo de fabrico e de pós-incubação. A tabela 2.2 classifica o iogurte em função do tipo (consistência), da sua composição e da matéria gorda.

Tabela 2.2: Classificação do iogurte em função da sua consistência, da sua composição e aromatização, e da matéria gorda (adaptado de Portaria nº 742/92).

Consistência	
Sólido	iogurte coagulado nas próprias embalagens individuais de venda a retalho. Não sofre homogeneização e o resultado é um produto de textura firme
Batido	iogurte previamente coagulado em fermentadores e posteriormente embalado, cujo resultado é um produto com uma textura cremosa
Líquido	iogurte liquefeito depois de coagulado e posteriormente embalado. O processo de fermentação é realizado em tanques, gerando a fluidez do produto final
Composição	
Natural	iogurte sem quaisquer adições para além do leite e das culturas microbianas
Açucarado	iogurte natural com adição de sacarose ou outros açúcares, edulcorantes e emulsionantes
Aromatizado	iogurte ao qual foram adicionados ingredientes aromáticos ou aditivos alimentares
Com pedaços de fruta	iogurte aromatizado ou não, ao qual foram adicionados pedaços de fruta
Matéria gorda	
Gordo	iogurte com teor mínimo de matéria gorda, na parte láctea de 3,5% (m/m)
Meio-gordo	iogurte com teor mínimo de matéria gorda, na parte láctea de 1,5% (m/m) e máximo de 1,8% (m/m)
Magro	iogurte com teor máximo de matéria gorda de 0,3% (m/m)

Segundo Tamime (2006), apesar dos inúmeros tipos de iogurte existentes, a essência do processo é a mesma, variando apenas o tipo de leite utilizado e a espécie microbiana predominante na fermentação.

2.2.3. Processo geral de fabrico

Uma das mais importantes etapas da produção de iogurte é a selecção das matérias-primas. Os produtores devem certificar-se que estas são de alta qualidade e que não contêm nenhum tipo de impurezas impróprias para a produção, uma vez que serão responsáveis pelas propriedades sensoriais e valor nutricional do iogurte.

O iogurte pode ser produzido a partir do leite de vaca, búfala, cabra, ovelha e outros mamíferos. Contudo, na produção industrial do iogurte, o leite de vaca é a matéria-prima predominante (Tamime, 2006), e deve corresponder a um produto de alta qualidade. As matérias-primas utilizadas como ingredientes no fabrico do iogurte são (Portaria nº 742/92): leite pasteurizado ou leite pasteurizado concentrado; leite pasteurizado parcialmente desnatado ou leite pasteurizado parcialmente desnatado concentrado; leite pasteurizado desnatado ou leite pasteurizado desnatado concentrado; nata pasteurizada; mistura de duas ou mais das matérias-primas anteriores.

Após a selecção das matérias-primas adequadas, sucede-se o processo de fabrico propriamente dito (figura 2.1).

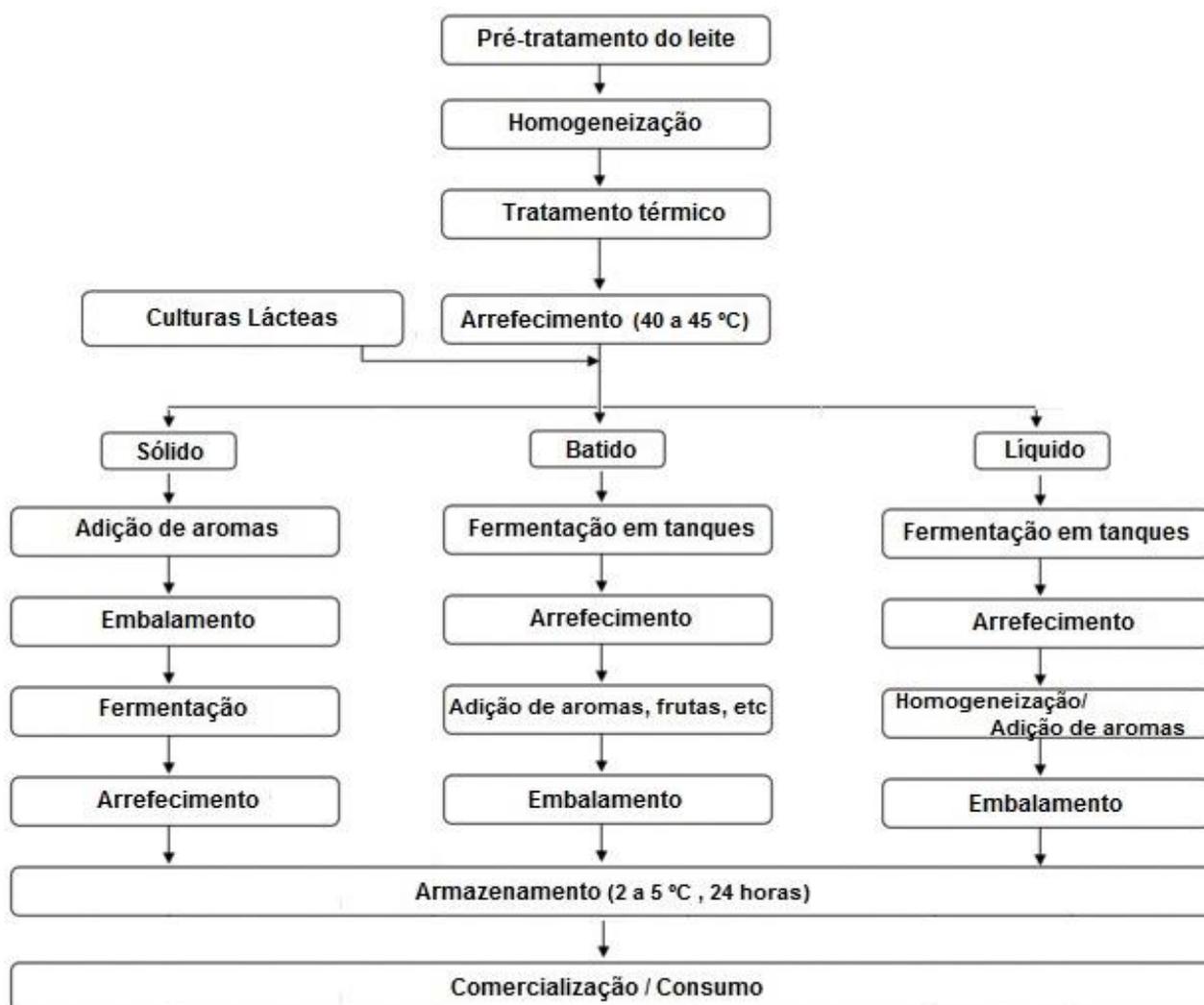


Figura 2.1: Diagrama geral de produção de iogurte sólido, batido e líquido (adaptado de Kardel e Antunes, 1997).

O processo de fabrico do iogurte inicia-se com o tratamento preliminar do leite, através da padronização da gordura, do ajuste do teor de sólidos não-gordurosos (principalmente lactose, proteínas e minerais), e da fortificação, que consiste na adição de ingredientes ao leite (como açúcar, leite em pó, proteínas do soro, substâncias edulcorantes, entre outros), seguida de uma homogeneização a alta pressão (20 - 25 MPa) (Kardel e Antunes, 1997; Tamime, 2006).

Posteriormente, procede-se ao tratamento térmico (em pasteurizadores, a 85 °C durante 30 minutos ou a 95 °C durante 5 minutos) da mistura de leite, que visa fundamentalmente eliminar os microrganismos patogénicos e/ou indesejáveis, e desnaturar as proteínas do soro que interagem com a caseína, deixando-a livre para a coagulação, o que possui grande efeito sobre a viscosidade do iogurte e sobre a sua digestibilidade no tracto gastrointestinal (Chandan *et al.*, 2006; Tamime, 2006). Após o tratamento térmico, a mistura de leite é arrefecida até uma temperatura entre os 40 e os 45 °C, ideal para a actividade fermentativa das culturas lácteas.

Durante o processo de fermentação láctica ocorre a conversão anaeróbica parcial dos hidratos de carbono presentes no leite (lactose), sendo o ácido láctico o principal produto obtido, para além de outras substâncias orgânicas que influenciam as características organolépticas do iogurte (Silva *et al.*, 2012).

Inicialmente, as bactérias ácido lácticas (*Lactic Acid Bacteria*, LAB), responsáveis pela fermentação, actuam sobre o substrato lactose, que sofre uma hidrólise, por acção da enzima β -galactosidase, levando à separação dos seus sacarídeos, glicose e galactose. A glicose é então reduzida a ácido láctico, pelas LAB, provocando um decréscimo no pH, contribuindo, assim, para a coagulação das proteínas do leite (caseína) e a formação de coágulos, comumente conhecidos como coalho (Farnworth, 2008; Silva *et al.*, 2012; Tamime, 2006).

O processo de fermentação pode ser realizado na própria embalagem de comercialização, caso se queira obter um iogurte de consistência sólida, ou em tanques próprios para o efeito, caso se queira obter um iogurte batido e/ou líquido (Kardel e Antunes, 1997; Portaria nº 742/92). No entanto, independentemente do tipo de iogurte a ser fabricado, as reacções bioquímicas responsáveis pela formação do coágulo são exactamente as mesmas, diferenciando-se apenas nas propriedades reológicas do coágulo (Kardel e Antunes, 1997).

A fermentação é realizada num período mínimo de 3 horas, até atingir o pH de, aproximadamente, 4,5 (Kardel e Antunes, 1997; Souza, 1991), seguindo-se um novo arrefecimento até aos 15 – 22 °C. Nesta fase, são então adicionados alguns géneros alimentícios aromáticos ao iogurte, tais como frutas e vegetais (frescos, congelados, em pó, conservados e em compota), derivados de frutas e vegetais (sumos, sumos concentrados, polpas, polmes e xaropes), sementes ou parte de sementes comestíveis, mel, café, chocolate, cacau e especiarias. Podem ainda ser utilizados agentes adoçantes, espessantes e edulcorantes, de acordo com as características pretendidas, desde que atendidas as normas estabelecidas pela legislação em vigor (Portaria nº 742/92, Tamime, 2006).

Por fim, procede-se ao embalamento do iogurte em copos de plástico ou vidro e ao seu armazenamento entre 2 e 5 °C, durante 24 horas. O iogurte fica então pronto para comercialização/consumo (Kardel e Antunes, 1997).

2.2.4. Composição nutricional

O iogurte, por ser um derivado do leite, é um alimento de elevado valor nutricional e o seu consumo regular apresenta inúmeras vantagens para a saúde humana. Embora a sua composição seja semelhante à da sua matéria-prima, ocorrem diversas alterações bioquímicas durante a fermentação do iogurte, que o tornam ainda mais nutritivo e com diferentes efeitos benéficos para os consumidores. Em geral, o consumo deste produto está associado à imagem positiva de um alimento saudável e nutritivo, sendo uma importante fonte de (APN, 2015; Ashraf e Shah, 2011; Cano-Sancho *et al.*, 2015; INSA, 2015; Lidon e Silvestre, 2008; Mazahreh e Ershidat, 2009):

- **Energia**

O valor energético do iogurte varia, essencialmente, com a quantidade de gordura. Desta forma, os iogurtes gordos serão aqueles com um maior valor energético, em oposição aos magros e meio-gordos que fornecem uma menor quantidade de energia.

- **Proteínas**

As proteínas do iogurte são de elevado valor biológico e mais facilmente digeridas do que as do leite, uma vez que as proteínas do leite são coaguladas devido ao tratamento térmico, à acção proteolítica das LAB e ao baixo valor de pH.

- **Hidratos de carbono**

Os hidratos de carbono presentes são maioritariamente açúcares, sendo o principal a lactose. Porém, o seu teor em lactose é baixo, uma vez que esta é parcialmente transformada em ácido láctico, por acção das LAB, durante o processo de fermentação.

- **Lípidos**

A quantidade de gordura no iogurte varia com o tipo de iogurte, sendo que os magros contêm uma menor quantidade deste nutriente. Contrariamente, os iogurtes gordos apresentam uma quantidade de gordura superior, factor pelo qual estes são mais cremosos.

- **Vitaminas**

As principais vitaminas presentes no iogurte são do complexo B: vitamina B1, B2, B3, B6, B9 e B12. Algumas perdas de vitaminas podem ocorrer durante o processamento do iogurte, quer devido ao tratamento térmico, quer por parte das LAB que utilizam vitaminas para o seu desenvolvimento.

- **Minerais**

Os produtos lácteos, em especial o iogurte, destacam-se por serem uma boa fonte de cálcio, essencial para a formação e mineralização óssea, sendo de extrema importância durante a gravidez, lactação, infância e menopausa, de forma a garantir um adequado desenvolvimento dos ossos e dentes e prevenir doenças como a osteoporose. Este elemento está presente no iogurte em maiores quantidades que no leite *in natura*, devido à etapa de fortificação no processo de produção. Os iogurtes são também uma boa fonte de fósforo e magnésio (importantes para a formação óssea e reparação de tecidos) e de potássio (participa na contracção muscular e regulação da pressão sanguínea).

A Tabela 2.3 apresenta alguns exemplos da composição nutricional de diferentes tipos de iogurtes, por 100 g de parte edível.

Tabela 2.3: Composição nutricional de diferentes tipos de iogurtes, por 100 g de parte edível (adaptado de INSA, 2015)

logurte	Energia (kcal)	Proteína (g)	Hidratos carbono (g)	Lípidos (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Potássio (mg)	Magnésio (mg)	Vitamina B1 (mg)	Vitamina B2 (mg)	Vitamina B3 (mg)	Vitamina B6 (mg)
Natural sólido magro	42	4,6	5,2	0,2	160	125	202	14	0,040	0,27	0,20	0,031
Natural sólido meio gordo	54	4,2	5,0	1,8	118	108	183	12	0,030	0,24	0,20	0,034
Aromatizado açucarado sólido magro	68	5,0	11,8	0,1	152	123	208	12	0,040	0,30	0,20	0,034
Aromatizado açucarado sólido meio gordo	71	4,1	10,1	1,6	130	101	168	12	0,030	0,21	0,20	0,032
Aromatizado açucarado líquido magro	61	3,2	11,6	0,3	81	121	72	8,0	0,020	0,18	0,20	0,030
Aromatizado açucarado líquido meio gordo	70	3,0	11,5	1,3	105	78	98	8,0	0,020	0,17	0,20	0,032
Aromatizado açucarado batido meio gordo	85	4,4	12,5	2,0	129	119	195	12	0,040	0,28	0,20	0,038
Aromatizado açucarado batido gordo	82	3,9	8,5	3,6	135	95	137	18	0,020	0,18	0,20	0,033
Açucarado batido meio gordo com fruta	91	4,3	14,6	1,7	134	114	209	12	0,030	0,25	0,10	0,042
Açucarado batido gordo com fruta	95	4,2	12,4	3,2	125	91	154	10	0,030	0,17	0,20	0,033

2.2.4. Culturas Lácteas

Vários são os microrganismos empregados no desenvolvimento de produtos lácteos. Na produção de iogurtes, são utilizadas culturas lácticas tradicionais, também denominadas por flora específica do iogurte, segundo a Portaria nº 742/92, e/ou bactérias probióticas, devido às suas boas características tecnológicas, terapêuticas e sensoriais.

2.2.4.1. Flora específica

A produção do iogurte envolve, basicamente, uma cultura láctica tradicional composta por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Ambos os microrganismos são termófilos, homofermentativos e produtores de ácido láctico (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001; Salminen *et al.*, 1998; Tamime, 2006).

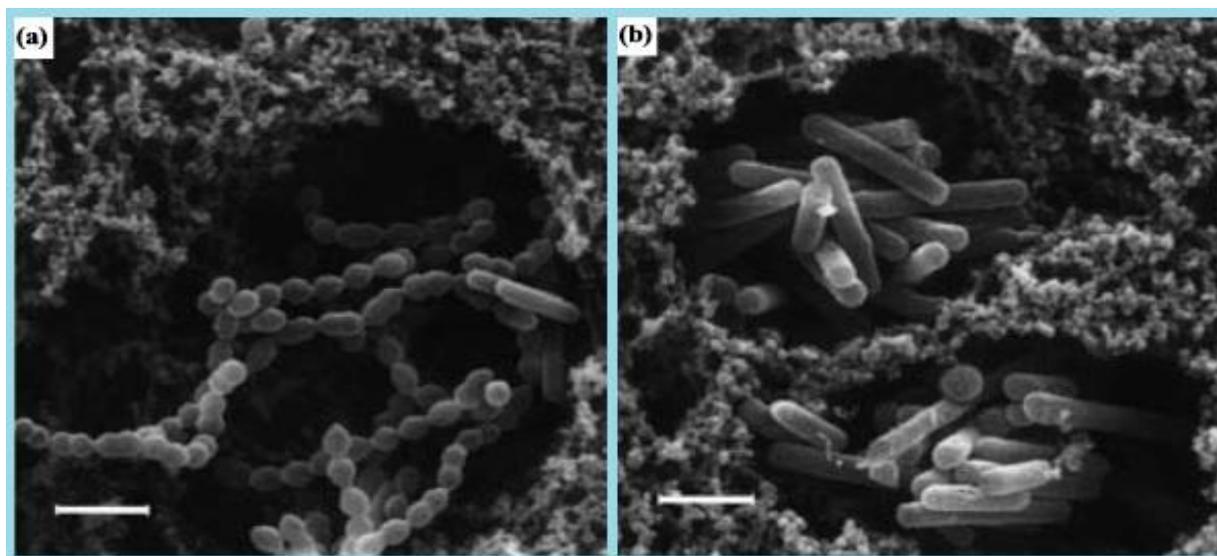


Figura 2.2: Visualização microscópica de colônias de (a) *S. thermophilus* e (b) *L. bulgaricus* no iogurte. Barra corresponde a 2 μm (adaptado de Tamime, 2006)

Os *S. thermophilus* (figura 2.2 a) são a única espécie do gênero utilizada como inóculo para a produção de iogurte. Do ponto de vista morfológico, apresentam-se na forma de cocos ou ovais, com dimensões compreendidas entre 0,5 e 2 μm de diâmetro, em cadeias ou em pares. São bactérias Gram-positivas, catalase negativa, anaeróbias facultativas (com capacidade de propagação na presença de oxigênio), imóveis, não-esporuladas e homofermentativas, produzindo principalmente ácido láctico e, em menor quantidade, diacetilo, acetaldeído, ácido fórmico e ácido pirúvico, a partir da lactose (Breed *et al.*, 1957; Henry, 1996; Robinson, 2002; Tamime, 2006). São microrganismos termófilos, cuja temperatura ótima de crescimento está entre os 35 a 42 °C (Radke-Mitchell e Sandine, 1986).

Os *L. bulgaricus* (figura 2.2 b) apresentam-se em forma de bastonetes, com dimensões compreendidas entre 1,2 e 2 μm de comprimento, unidos em cadeias longas. São bactérias Gram-positivas, catalase negativa, anaeróbias facultativas, não-esporuladas, imóveis e homofermentativas,

produzindo como produto principal da fermentação o ácido láctico, e, como produto secundário, o acetaldeído (Breed *et al.*, 1957; Robinson, 2002; Salminen *et al.*, 1998; Tamime, 2006). São microrganismos termófilos, cuja temperatura ótima de crescimento está entre os 43 a 46 °C (Radke-Mitchell e Sandine, 1986).

Alguns autores defendem a existência de uma relação simbiótica entre os *S. thermophilus* e os *L. bulgaricus*, durante o processamento do iogurte. No início da fermentação, a acidez do leite favorece o crescimento dos *S. thermophilus*, estimulado por alguns péptidos e aminoácidos essenciais livres produzidos pelos *L. bulgaricus*. Os *S. thermophilus*, em contrapartida, produzem ácido láctico, ácido fórmico e dióxido de carbono, reduzindo o pH do meio e proporcionando condições anaeróbias, estimulando, assim, o crescimento dos *L. bulgaricus* (Horiuchi e Sasaki, 2012; Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001; Radke-Mitchell e Sandine, 1986; Suzuki *et al.*, 1986; Tamime, 2006). Os *S. thermophilus* são inibidos quando o pH atinge valores de 4,2 - 4,4, enquanto que os *L. bulgaricus* toleram valores de pH no intervalo de 3,5 - 3,8 (Tamime e Robinson, 2007). Depois de 3 horas de fermentação, os *L. bulgaricus* continuam a reduzir o pH devido à produção de quantidades excessivas de ácido láctico. O pH do iogurte comercial é geralmente no intervalo de 3,7 - 4,6 (Hamann e Marth, 1983; Souza, 1991).

De acordo com Radke-Mitchell e Sandine (1986), a proporção entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* é de extrema importância para o desenvolvimento do *flavour* do iogurte. Quando os *S. thermophilus* são predominantes no iogurte, este resulta num sabor ácido suave com um aroma mais completo. Por outro lado, a predominância de *L. bulgaricus* resulta num iogurte com um sabor mais ácido e um aroma melhorado devido à formação de acetaldeído, sendo este o principal responsável pelo aroma característico do iogurte (Kneifel *et al.*, 1992; Pette e Lolkema, 1950; Radke-Mitchell e Sandine, 1986). Já Pette e Lolkema (1950), afirmam que para se desenvolver um *flavour* apropriado, o rácio entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* deverá estar na gama de 1:1 a 3:1.

Segundo Lourens-Hattingh e Viljoen (2001), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e a baixos valores de pH. Para evitar a pós-acidificação do iogurte, as indústrias fabricantes de culturas lácteas fornecem culturas tradicionais de iogurte com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*.

Estas bactérias tradicionais, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, não pertencem à flora intestinal, não são resistentes à bÍlis e, conseqüentemente, não sobrevivem à passagem pelo tracto gastrointestinal, portanto não são consideradas como probióticas. No entanto, estas bactérias possuem efeitos benéficos para a saúde humana, como acção inibidora contra bactérias patogénicas e melhoria da digestão da lactose devido a presença da enzima β -galactosidase nas células das bactérias tradicionais do iogurte (Ashraf e Shah, 2011; Farnworth, 2008; Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001; Saccaro *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Tamime, 2006).

2.2.4.2. Probióticos

Durante as últimas duas décadas, microrganismos probióticos foram adicionados em vários géneros alimentícios, especialmente nos leites fermentados, cujo valor nutritivo é bastante reconhecido e os seus efeitos benéficos na saúde amplamente documentados (Ashraf e Shah, 2011; Gaggia *et al.*, 2011; Saarela *et al.*, 2000; Saccaro *et al.*, 2012; Shieh *et al.*, 2011).

O termo probiótico deriva do grego *pro* e *bios* e significa “para a vida”. Este termo foi introduzido por Lilly e Stillwell em 1965 para descrever as substâncias secretadas por um microrganismo, o qual estimula o crescimento do outro. Desde então, várias definições foram feitas para os probióticos, dependendo de seus efeitos sobre a saúde do hospedeiro (Fuller, 1989; Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001).

Parker, em 1974, foi o primeiro a definir o termo probiótico no sentido em que é usado hoje, conceituando como “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal”. Contudo, o termo probiótico foi redefinido por Fuller, em 1989, como um “suplemento alimentar composto de microrganismos vivos, os quais têm efeitos benéficos para o hospedeiro, por manter ou melhorar seu equilíbrio microbiano intestinal” (Fuller, 1989; Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001).

Anos mais tarde, em 2001, a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a WHO (*World Health Organization*) definiram probiótico como microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, proporcionam um efeito benéfico ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Os microrganismos com propriedades probióticas (tabela 2.4) desempenham um importante papel terapêutico, nomeadamente (Ashraf e Shah, 2011; Ejtahed *et al.*, 2011; FAO/WHO, 2001; Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001; Marteau *et al.*, 2001; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Williams, 2010):

- Prevenção de doenças associadas ao tracto gastrointestinal, como diarreias causadas por algumas bactérias patogénicas e vírus, através da inibição do seu crescimento e aderência à parede gastrointestinal;
- Redução de sintomas de alergias alimentares, como o caso da intolerância à lactose e alergias à caseína;
- Atenuação da Síndrome do Intestino Irritável e doença do Crohn;
- Regularização da função intestinal, combatendo a obstipação intestinal;
- Controlo de infecções causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*, associada a gastrites, úlceras pépticas e cancro gástrico, através da libertação de bactericidas e/ou ácidos orgânicos;
- Prevenção do cancro do cólon e outros tipos de cancro, auxiliando o reforço das propriedades anticancerígenas e, conseqüentemente, reduzindo os níveis dos compostos carcinogénicos;
- Estímulo do sistema imunitário, e conseqüente redução do efeito nefasto do uso de antibióticos;
- Diminuição do risco de doenças cardiovasculares, através da redução da pressão arterial e da concentração de colesterol;
- Tratamento de infecções do sistema urinário.

Tabela 2.4: Microrganismos com propriedades probióticas (adaptado de Holzapfel *et al.*, 2001).

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Outras bactérias ácido lácticas	Outros microrganismos
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E.coli</i> Nissle 1917
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidolactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Contudo, para que um microrganismo probiótico possa ser administrado oralmente, este deve obedecer aos seguintes requisitos (Biavati *et al.*, 2000; Ouwehand *et al.*, 2003; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Muramalla e Aryana, 2011; Saarela *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 2011; Williams, 2010):

- Não ser patogénico;
- Apresentar efeitos benéficos evidentes para a saúde;
- Ser geneticamente estável e ter origem humana (um probiótico exerce melhor a sua actividade num ambiente similar ao ambiente do qual foi originalmente retirado);
- Sobreviver à passagem pelo tracto gastrointestinal (resistência às enzimas pancreáticas, ácido e biliar), chegar ao intestino em quantidades suficientes para exercer a sua actividade e ter uma boa capacidade de adesão e colonização na mucosa intestinal;
- Demonstrar antagonismo contra as bactérias patogénicas (como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*) através da produção de substâncias antimicrobianas ou por competição exclusiva;
- Ter capacidade de suportar os processos tecnológicos e permanecer viável durante todo o tempo de validade do produto alimentar;
- Ter propriedades antimutagénicas e anticarcinogénicas;
- Se apresentar resistência aos antibióticos, não transmitir ou induzir essa resistência ao hospedeiro.

A eficácia dos probióticos depende da sua capacidade intrínseca para resistirem à passagem pelo tracto gastrointestinal e colonizarem a mucosa intestinal, a partir de uma ingestão regular que permita manter concentrações eficazes de organismos vivos e viáveis, sendo a probabilidade de colonização intestinal directamente proporcional à quantidade ingerida destes microrganismos (Williams, 2010).

A Tabela 2.5 relaciona os organismos probióticos, dosagens e regime recomendados com algumas indicações clínicas, baseados em doses que se verificaram eficazes em vários estudos com seres humanos.

Tabela 2.5: Espécies de probióticos, dosagens e regime recomendados para algumas indicações clínicas (adaptado de Williams, 2010).

Indicação clínica	Probiótico	Dosagem e regime recomendados
Diarreia infecciosa aguda em crianças	<i>L. reuteri</i>	$10^{10} - 10^{11}$ UFC ^a , 2x /dia (2 – 5 dias)
	<i>L. rhamnosus</i>	$10^{10} - 10^{11}$ UFC, 1x /dia (5 dias)
Diarreia associada a antibióticos	<i>Saccharomyces boulardii</i>	$4 \times 10^9 - 2 \times 10^{10}$ UFC, 1x /dia (1 – 4 semanas)
	<i>L. rhamnosus</i>	$6 \times 10^9 - 4 \times 10^{10}$ UFC, 1x /dia (1 – 2 semanas)
	<i>L. acidophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	2×10^9 UFC, 1x /dia (5 – 10 dias)
	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. longum</i>	5×10^9 UFC, 1x /dia (7 dias)
	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i>	1×10^{11} UFC, 1x /dia (21 dias)
Infecção por <i>Clostridium difficile</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	2×10^{10} UFC (1g), 1x /dia (4 semanas), associado a vancomicina e/ou metronidazole
Diarreia do viajante	<i>L. rhamnosus</i>	2×10^9 UFC, 1x /dia (iniciar 2 dias antes da partida e manter durante a viagem)
	<i>Saccharomyces boulardii</i>	$5 \times 10^9 - 2 \times 10^{10}$ UFC, 1x /dia (iniciar 5 dias antes da partida e manter durante a viagem)
Síndrome do Intestino Irritável	VSL#3 ^b	9×10^{11} UFC, 1x /dia (8 semanas)
	<i>B. infantis</i>	$10^6 - 10^{10}$ UFC, 1x /dia (4 semanas)
	<i>L. rhamnosus</i> e outros	$8 - 9 \times 10^9$ UFC, 1x /dia (6 meses)
Colite ulcerosa	<i>E.coli</i> Nissle 1917	5×10^{10} bactérias, 2x /dia até remissão (máximo 12 semanas)
	<i>Saccharomyces boulardii</i>	250 mg + mesalamina, 3x /dia (4 semanas)
	VSL#3	$1,8 \times 10^{12}$ bactérias + terapia convencional, 2x /dia (6 semanas)
Doença de Crohn	<i>Saccharomyces boulardii</i>	1g + mesalamina, 1x /dia (6 meses)
Prevenção de doença atópica	<i>L. rhamnosus</i>	10^{10} UFC, 1x /dia (2 – 4 semanas)

^a Unidade Formadora de Colónias (UFC).

^b VSL#3 é uma mistura de oito organismos probióticos (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis* e *S. thermophilus*).

Geralmente os organismos probióticos são consumidos sob a forma de produtos lácteos fermentados, sendo, neste caso, considerados como alimentos funcionais, ou seja, alimentos que podem proporcionar efeitos benéficos para a saúde e/ou reduzir o risco de doenças crônicas, para além de fornecerem a função nutricional básica (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001).

Estes microrganismos representam um grande investimento de pesquisa, principalmente para o desenvolvimento de produtos lácteos probióticos, sendo as espécies *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., as mais utilizadas pela indústria (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001; Saarela *et al.*, 2000; Salminen *et al.*, 1998).

2.2.4.2.1. Bifidobactérias

As bifidobactérias (figura 2.3) foram originalmente isoladas e descritas por Henry Tissier, em 1899, que observou uma bactéria em forma de Y nas fezes de crianças que se alimentavam de leite materno, denominando-a de *Bacillus bifidus*, devido à sua morfologia bifurcada (Biavati *et al.*, 2000; Mazo *et al.*, 2009). Anos mais tarde, em 1920, Holland nomeou a estirpe isolada por Tissier de *Lactobacillus bifidus* (Biavati *et al.*, 2000).

O género *Bifidobacterium* spp. foi originalmente proposto por Orla-Jensen, em 1924, mas só em 1986 foi aceite e reconhecido como um género independente (Mazo *et al.*, 2009). Actualmente, o género pertence ao Filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, Ordem *Bifidobacteriales* e Família *Bifidobacteriaceae*, sendo representado por 37 espécies (Turroni *et al.*, 2011), onde 11 são isoladas de humanos (*B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. sacardovi*) (Ward e Roy, 2005).

As bifidobactérias são habitantes naturais do tracto gastrointestinal humano e animal, porém a sua população é influenciada por factores como a idade do indivíduo, a dieta, o uso de antibióticos, o stress, entre outros (Arunachalam, 1999).

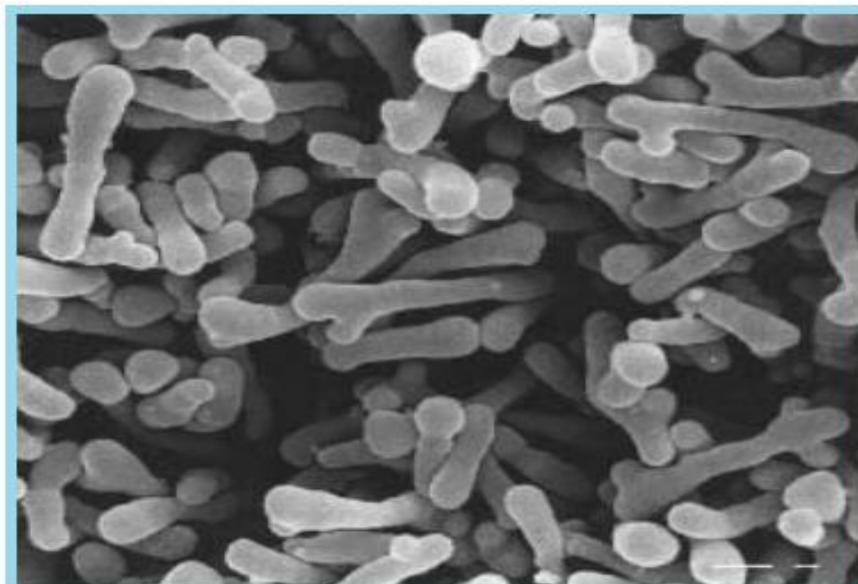


Figura 2.3: Visualização microscópica de colônias de *Bifidobacterium* spp.

Barra corresponde a 1 μm (adaptado de Biavati *et al.*, 2000)

As bifidobactérias são caracterizadas por serem bactérias Gram-positivas, catalase negativa, anaeróbias, sendo que algumas espécies são aerotolerantes, como no caso de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, apresentam uma morfologia ramificada em forma de Y, não-esporuladas e sem motilidade (Holt *et al.*, 1994; Tomaselli *et al.*, 2011).

São microrganismos heterofermentativos com produção de ácido acético e láctico na proporção de 3:2, sem formação de CO₂, excepto durante a degradação do gluconato, e são capazes de utilizar a glicose, galactose, lactose e a frutose como fontes de carbono (Gomes e Malcata, 1999).

A temperatura ótima para crescimento de bifidobactérias oscila entre 37 e 41 °C (Gomes e Malcata, 1999), não havendo crescimento a temperaturas abaixo de 25 - 28 °C e acima de 43 - 45 °C (Mazo *et al.*, 2009). O pH ótimo de crescimento compreende a faixa entre 6,5 e 7,0, não havendo crescimento a pH inferior a 5,1 ou superior a 8,0 (Arunachalam, 1999; Tomaselli *et al.*, 2011).

As bifidobactérias são consideradas como organismos altamente susceptíveis ao oxigénio, apesar de existirem espécies mais tolerantes que outras. O oxigénio pode afectar estas bactérias devido à sua toxicidade e pela produção de peróxido de hidrogénio (Mazo *et al.*, 2009).

Os estudos realizados por Beerens e colaboradores (2000), sobre o efeito da exposição ao ar de 84 estirpes de bifidobactérias isoladas de alimentos (28 de origem humana e 56 de origem animal), levaram a concluir que as espécies de origem animal (*B. thermophilum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* e *B. pseudolongum* subsp. *globosum*) mostraram-se mais resistentes ao oxigénio do que as de origem humana (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*). Contudo, todas as espécies de bifidobactérias examinadas foram suficientemente aerotolerantes (Beerens *et al.*, 2000).

Várias espécies de bifidobactérias, originárias do tracto gastrointestinal humano, incluindo *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis* e *B. longum*, são aplicadas durante ou após o processo de fabrico de iogurtes, juntamente com as bactérias tradicionais (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) para obtenção de produtos de qualidade que proporcionam, para além das suas propriedades sensoriais e da sua função nutricional básica, benefícios à saúde do consumidor (Saarela *et al.*, 2000; Tamime, 2006; Ward e Roy, 2005).

Segundo alguns autores, para que um iogurte probiótico possa proporcionar o seu efeito terapêutico, deve-se consumir cerca de 100 gramas deste, por dia, contendo no mínimo 10⁶ unidades formadoras de colónias de microrganismos probióticos por grama de iogurte (UFC/g) (Arunachalam, 1999; Ashraf e Shah 2011; Kamila, 2012; Lourens-Hatting e Viljoen, 2001; Kailasapathy e Rybka, 1997; Kurmann e Rasic, 1991; Matilla-Sandholm *et al.*, 2002; Saccaro *et al.*, 2012; Samona e Robinson, 1994).

2.2.5. Consumo em Portugal

Os dados estatísticos, publicados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), referentes aos hábitos de consumo humano de leites fermentados (incluindo iogurtes) *per capita* (kg/habitante) da população portuguesa, para o período de 1983 a 2013, são apresentados na tabela 2.6. A figura 2.4 mostra a evolução do consumo humano anual para o período em análise.

Tabela 2.6: Consumo humano *per capita* (kg/habitante) de leites fermentados (incluindo iogurtes), da população portuguesa, no período de 1983 a 2013 (adaptado de INE, 2015).

Anos	Consumo de leites fermentados (kg/habitante/ano)
1983	2,7
1984	2,5
1985	3,0
1986	3,7
1987	4,7
1988	5,4
1989	5,8
1990	6,7
1991	7,8
1992	6,7
1993	6,7
1994	7,8
1995	9,0
1996	9,3
1997	10,7
1998	11,8
1999	14,6
2000	15,0
2001	18,1
2002	18,3
2003	18,5
2004	20,2
2005	21,1
2006	21,9
2007	21,5
2008	20,9
2009	23,0
2010	21,8
2011	23,2
2012	22,3
2013	22,4

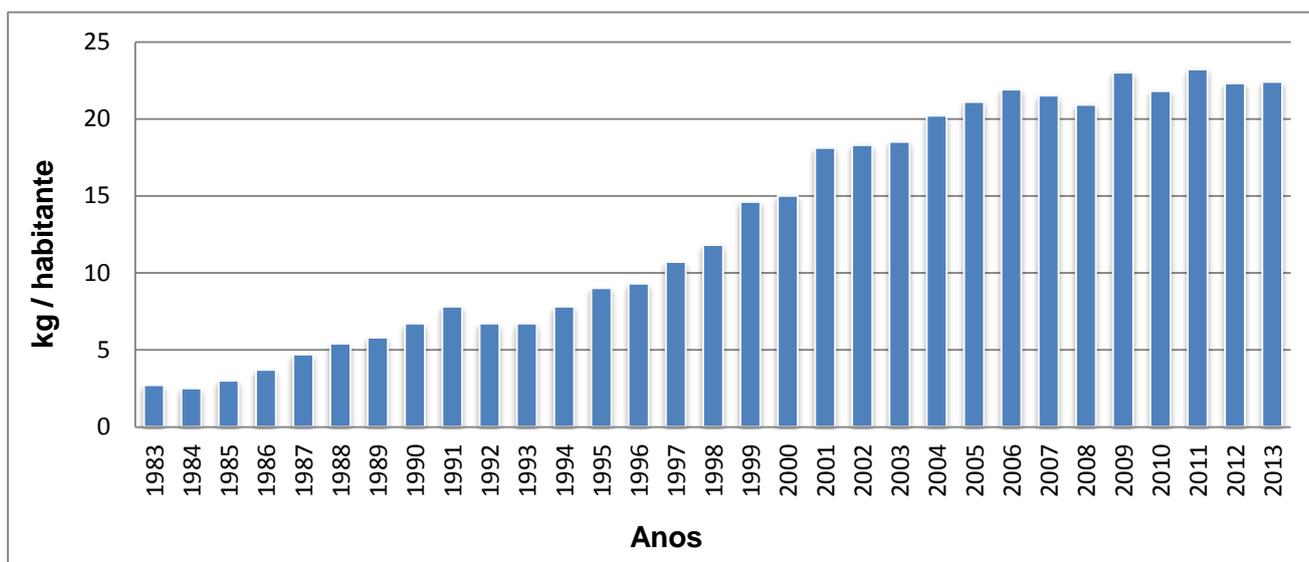


Figura 2.4: Evolução do consumo humano (kg/habitante/ano) de leites fermentados (incluindo iogurtes) da população portuguesa, no período de 1983 a 2013.

É do conhecimento geral que a população portuguesa está cada vez mais preocupada com a sua alimentação, bem como em mudar alguns dos seus hábitos alimentares.

Durante muito tempo, o consumo de leites fermentados esteve associado ao iogurte produzido com culturas lácteas tradicionais (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*). Porém, nas últimas duas décadas, o uso de probióticos, em leites fermentados, levou a uma forte procura destes produtos pelos consumidores, uma vez que estes estão associados à imagem positiva de alimento saudável, não só por melhorarem as características do produto tradicional, como reduzir a pós-acidificação do iogurte (facto evidenciado pela acção de *Lactobacillus acidophilus* e de bifidobactérias), mas por serem considerados como “agentes terapêuticos”, ou seja, microrganismos que promovem efeitos benéficos à saúde dos indivíduos que os ingerem (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001).

Ao observar os dados da tabela 2.6 e a figura 2.4, constata-se que o iogurte está em plena expansão e com uma perspectiva de crescimento contínuo, como era de esperar, uma vez que o consumo humano de leites fermentados (incluindo iogurtes), apresentou um resultado 8 vezes superior no período em análise, passando de uma capitação bruta anual de 2,7 kg/habitante, em 1983, para 22,4 kg/habitante, em 2013.

Conclui-se, então, que os iogurtes têm uma relevância proeminente nos hábitos alimentares dos portugueses, não só por serem considerados um substituto do leite, mas também por possuir várias características sensoriais, nutritivas e terapêuticas indispensáveis para o bem-estar da população.

Este facto condiciona as necessidades do mercado, o que faz com que as empresas produtoras de laticínios invistam na investigação e desenvolvimento de novos produtos, através do uso de novas técnicas sensoriais (por exemplo, texturas e sabores), de forma a que estes atendam às expectativas do consumidor; de estratégias de marketing, como embalagens originais, slogans atractivos e publicidade direccionada ao público-alvo; e, por fim, preços apelativos.

Esta introdução de variedades é a principal causa do grande aumento da produção de iogurtes nestes últimos anos. Deste modo, pode-se afirmar que esta actividade tem um impacto significativo tanto social como económico.

2.2.6. Consumo mundial

Estendendo o estudo relativo ao consumo humano de iogurtes para um contexto geográfico mais alargado, analisou-se a informação estatística do consumo de iogurtes, fornecida pela Danone, com a finalidade de comparar o consumo *per capita* (kg/habitante) de iogurtes em Portugal, com o consumo nos restantes países do mundo. Desta forma, a figura 2.5 ilustra o consumo de iogurte em 15 países, expresso em copos/pessoa/ano (c./p./a.), no ano de 2013, sendo que cada copo equivale a, aproximadamente, 125 gramas de iogurte (Danone, 2015).



Figura 2.5: Consumo humano de iogurtes em 15 países do mundo, expressos em c./p./a. (copos/pessoa/ano), no ano de 2013 (adaptado de Danone, 2015).

Ao analisar a figura 2.5, verifica-se que a Holanda foi o país que apresentou, em 2013, o maior consumo humano de iogurtes – cerca de 285,6 c./p./a., correspondendo a um consumo anual de 35,7 kg/habitante – seguindo-se a Turquia com 281,6 c./p./a. (35,2 kg/habitante/ano) e, por fim, a França com 280 c./p./a. (35,0 kg/habitante/ano). Por sua vez, Portugal apresenta um consumo médio de 179,2 c./p./a. (22,4 kg/habitante/ano).

O Egipto, a Colômbia e o Brasil foram os países que apresentaram o consumo humano de iogurtes mais baixo, com os valores médios de 19,2 c./p./a. (2,4 kg/habitante/ano), 36 c./p./a. (4,5 kg/habitante/ano) e 51,2 c./p./a. (6,4 kg/habitante/ano), respectivamente.

Na Europa, a Itália foi o país que apresentou um consumo humano de iogurtes mais baixo, com 52,8 c./p./a. (6,6 kg/habitante/ano), juntamente com a Roménia com 54,4 c./p./a. (6,8 kg/habitante/ano).

3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

Fundada em 1878, na cidade de Rouen em França, como um entreposto francês para a inspecção do comércio internacional de cereais a granel, a empresa SGS foi registada em 1919 como *Société Générale de Surveillance* (figura 3.1), na cidade de Genebra (SGS, 2015).

Actualmente a SGS é a maior organização mundial no domínio da Inspeção, Verificação, Análise e Certificação, com sede em Genebra, e está presente em cerca de 140 países, operando em mais de 1 650 escritórios e laboratórios, contando com 80 000 colaboradores em todo o mundo (SGS, 2015).



Figura 3.1: Logotipo e slogan da SGS, S.A. (adaptado de SGS, 2015)

A SGS Portugal, S.A. foi fundada em 1922 pelo grupo SGS, tendo determinado que esta afiliada desenvolvesse a sua actividade pelos mesmos princípios geradores da acção do próprio grupo: a Independência, a Integridade, a Confidencialidade e a Inovação (SGS, 2015).

Originalmente dedicada ao controlo de operações de carga e descarga de cereais a granel, a SGS Portugal, S.A. foi alargando as suas actividades a outros sectores, adaptando-se às exigências do mercado. Os serviços abrangem inspecções, análises e ensaios, verificação metrológica acreditada, inspecções e auditorias técnicas nos mais diversos ramos. Possuem laboratórios acreditados nas áreas Agroalimentar, Detergentes, Produtos de Higiene, Cosméticos, Dispositivos Médicos, Ensaios Não Destrutivos, Ambiental e Segurança Ocupacional (SGS, 2015).

A SGS Portugal, S.A. assegura que os seus produtos cumprem os padrões internacionais, garantindo assim a segurança do consumidor.

O Laboratório de Ensaios Físico-Químicos, Microbiológicos e Amostragem da SGS Portugal, localizado no Pólo Tecnológico de Lisboa, é um dos mais modernos laboratórios do país.

Para o reconhecimento e para a aceitação dos resultados, a Acreditação é essencial, tal como a competência e formação dos técnicos. Por isso, além de contar com uma qualificada equipa, este Laboratório está acreditado desde 1992 de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025, tendo o mérito de ter sido um dos primeiros laboratórios privados em Portugal acreditado nesta área.

A sua capacidade reconhecida em diversas áreas de actuação, compreende (SGS, 2015):

- Laboratório de análises microbiológicas para produtos alimentares, águas, ambiente, detergentes, produtos de higiene e cosméticos (DPH) e dispositivos médicos;
- Laboratório de ensaios físico-químicos com competência para análises a produtos alimentares e águas, estando equipado para dar resposta de forma automática a cerca de 80% das suas análises de rotina;
- Laboratório de ensaios físico-químicos para análises a DPH;
- Rede de técnicos especializados para a recolha e transporte de amostras em Portugal Continental e Ilhas, estando a amostragem incluída no âmbito da acreditação;
- Área especializada em apreciação técnica de rotulagem e apoio no cumprimento da legislação em vigor.

4. METODOLOGIA

Como foi dito anteriormente, a presente dissertação propôs-se à implementação e validação da metodologia para a contagem de microrganismos característicos da flora específica do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) e de bifidobactérias em iogurtes, baseada nos procedimentos específicos das normas ISO 7889:2003 e 29981:2010, respectivamente.

O trabalho laboratorial decorreu no Laboratório de Microbiologia da empresa SGS Portugal S.A. e, como tal, utilizou-se os equipamentos e materiais disponíveis nestas instalações, para além de terem sido realizadas várias experiências preliminares que levaram à selecção dos parâmetros mais adequados para esse fim.

Segundo o procedimento operacional do Laboratório de Microbiologia da SGS Portugal S.A. para implementação de métodos, se o método a implementar for referente a contagens, como é o caso do presente trabalho, os resultados deverão ser analisados de forma a obter valores dentro do mesmo ciclo logarítmico, e deverão ser feitas análises em paralelo em, pelo menos, 15 amostras.

4.1. Amostragem

As amostras dos produtos alimentares analisadas, durante o estágio curricular, foram recolhidas pela estagiária, que teve o cuidado de verificar os rótulos dos mesmos, de modo a que os produtos em questão apresentassem os microrganismos em estudo.

Todos os iogurtes estão disponíveis no mercado português, pelo que, qualquer tipo de informação (marca e origem do produto, local da recolha, estabelecimento a que pertencia a amostra, etc.) que ponha em causa a integridade das empresas não será divulgado nesta dissertação.

As amostras foram colocadas num frigorífico a 4 °C antes da sua utilização e foram analisadas antes do término do prazo de validade.

Para este estudo, foram utilizadas:

- **20 amostras de iogurtes para a contagem da flora específica do iogurte, sendo que**

Amostra A: 4 iogurtes sólidos naturais de marca branca;

Amostra B: 4 iogurtes sólidos com aroma de morango de marca branca;

Amostra C: 4 iogurtes sólidos naturais de marca conceituada;

Amostra D: 4 iogurtes sólidos com aroma de morango de marca conceituada;

Amostra E: 4 iogurtes batido com pedaços de fruta de morango de marca conceituada.

- **20 amostras de iogurtes para a contagem de bifidobactérias, sendo que**

Amostra F: 4 iogurtes probióticos sólidos naturais de marca branca;

Amostra G: 4 iogurtes probióticos sólidos com aromas variados de marca branca;

Amostra H: 4 iogurtes probióticos sólidos com aromas variados de marca conceituada;

Amostra I: 4 iogurtes probióticos líquidos com aromas variados de marca branca;

Amostra J: 4 iogurtes probióticos líquidos com aromas variados de marca conceituada.

4.2. Diluente

Para realização da suspensão inicial e das diluições sucessivas utilizou-se água peptonada (BPW, *Buffered peptone water*) conforme indicado na norma ISO 6887-1:1999.

O diluente utilizado foi o da marca Bio-rad®, cuja composição é idêntica à composição exigida pela norma ISO 6887-1:1999 (peptona 0,1% p/v).

Na preparação do diluente, pesou-se 20,0 g de meio desidratado BPW (Bio-rad®) na balança analítica (Mettler®, modelo PM 1200). Seguidamente colocou-se o meio desidratado numa panela, adicionou-se 1000 ml de água destilada e aqueceu-se até à fervura numa placa de aquecimento (J.P. Selecta®).

Por fim, transferiu-se a solução para frascos de 500 ml e procedeu-se à esterilização na autoclave (Uniclave88®), durante 15 minutos a 121 °C ± 1 °C.

4.3. Meios de cultura e Suplementos

4.3.1. Meio MRS Agar

O meio utilizado no presente trabalho para a enumeração de *L. bulgaricus* foi o meio MRS Agar (De Man, Rogosa e Sharpe) da Merck®, cuja composição segue todos os requisitos exigidos pela norma ISO 7889:2003 (peptona 10,0 g; extracto de carne 10,0 g; extracto de levedura 4,0 g; glucose 20,0 g; Tween 80 – oleato de monosorbitol 1,0 ml; hidrogenortofosfato de dipotássio 2,0 g; acetato de sódio trihidratado 5,0 g; citrato de diamónio 2,0 g; sulfato de manganésio heptahidratado 0,2 g; sulfato de manganésio tetrahidratado 0,04 g; ágar 14,0 g).

Para a preparação do meio MRS Agar, pesou-se 68,2 g de meio desidratado MRS Agar (Merck®) na balança analítica (Mettler®, modelo PM 1200). Seguidamente, colocou-se o meio desidratado numa panela, adicionou-se 1000 ml de água destilada e aqueceu-se até à fervura numa placa de aquecimento (J.P. Selecta®). Transferiu-se 200 ml de meio para frascos de 250 ml e procedeu-se a esterilização na autoclave (Uniclave88®), durante 15 minutos a 121 °C ± 1 °C.

4.3.2. Meio M17 Agar

O meio utilizado no presente trabalho para a enumeração de *S. thermophilus* em iogurtes foi o meio M17 da LabM®, cuja composição segue todos os parâmetros exigidos pela norma ISO 7889:2003 (peptona trípsica de caseína 2,5 g; peptona pépsica de carne 2,5 g; peptona papaínica de soja 5,0 g; extracto de carne 5,0 g; extracto de levedura 2,5 g; β-glicerofosfato de sódio 19,0 g; sulfato de magnésio heptahidratado 0,25 g; ácido ascórbico 0,50 g; ágar 15,0 g).

Para a preparação do meio M17 Agar, pesou-se 57,2 g de meio desidratado M17 Agar (LabM®) na balança analítica (Mettler®, modelo PM 1200). Em seguida, colocou-se o meio desidratado numa panela, adicionou-se 1000 ml de água destilada e aqueceu-se até à fervura numa placa de aquecimento (J.P. Selecta®). Transferiu-se 95 ml de meio para frascos de 150 ml e procedeu-se a esterilização na autoclave (Uniclave88®), durante 20 minutos a 115 °C ± 1 °C.

4.3.2.1. Solução de Lactose 10%

Para a preparação da solução de lactose 10%, pesou-se 10,0 g de lactose desidratada, da marca Merck®, na balança analítica (Mettler®, modelo PM 1200). Colocou-se a lactose, posteriormente pesada, numa panela, adicionou-se 100 ml de água destilada e aqueceu-se a solução até à fervura numa placa de aquecimento (J.P. Selecta®).

Transferiu-se a solução para um frasco de 150 ml e procedeu-se à sua esterilização na autoclave (Uniclave88®), durante 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.3. Meio TOS Agar

O meio utilizado no presente trabalho para a contagem de bifidobactérias em produtos lácteos foi o meio TOS (Transgalactosylated Oligosaccharide) da Conda®, cuja composição segue todos os requisitos exigidos pela norma ISO 29981:2010 (hidrolizado enzimático de caseína 10,0 g; extracto de levedura 1,0 g; hidrogenofosfato de dipotássio 4,8 g; dihidrogenofosfato de potássio 3,0 g; sulfato de amónio 3,0 g; sulfato de magnésio heptahidratado 0,2 g; hidrocloreto de L-cisteína monohidratado 0,5 g; propionato de sódio 15,0; galactoligosacarídeo 10,0 g; ágar 15,0 g).

Para a preparação do meio TOS Agar, pesou-se 62,5 g de meio desidratado TOS Agar (Conda®) na balança analítica (Mettler®, modelo PM 1200). Em seguida, colocou-se o meio desidratado numa panela, adicionou-se 950 ml de água destilada e aqueceu-se até à fervura numa placa de aquecimento (J.P. Selecta®). Transferiu-se 190 ml de meio para frascos de 250 ml e procedeu-se à esterilização do meio na autoclave (Uniclave88®), durante 15 minutos a $115\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.3.1. Solução MUP

O antibiótico MUP (*Mupirocin lithium salt*) é utilizado para inibir o crescimento da maioria das bactérias produtoras de ácido láctico, comumente utilizadas em produtos lácteos fermentados. No presente trabalho, o antibiótico MUP, da marca Merck®, é utilizado como suplemento ao meio TOS para inibir o crescimento de microrganismos específicos do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*), de culturas mesofílicas (*Lactobacillus lactis*), de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus*.

Para a preparação do suplemento MUP (Merck®), adicionou-se 25 ml de água destilada, previamente esterilizada, a um frasco contendo 25 mg de MUP desidratado e agitou-se suavemente.

4.4. Procedimento Experimental

Todo o procedimento experimental desde o ponto 4.4.1 ao ponto 4.4.3.4 (inclusive) foi realizado em condições de assepsia na câmara de fluxo laminar horizontal (ESI Fluframe®).

4.4.1. Preparação da diluição primária

Os métodos usados para o isolamento e contagem de microrganismos presentes em alimentos sólidos, pastosos e/ou líquidos, exigem o tratamento prévio da amostra de forma a transferir para uma fase líquida, os microrganismos presentes no seu interior ou aderentes à sua superfície.

Desta forma, iniciou-se a actividade laboratorial com a preparação da suspensão inicial (diluição primária, 10^{-1}), onde pesou-se, assepticamente, 10,0 g \pm 0,1 g de amostra para um saco de Stomacher esterilizado, e perpez-se o volume de 100 ml com o diluente BPW.

Colocou-se o saco fechado no Stomacher (Stomacher 400 Laboratory Blender) e homogeneizou-se a solução durante 30 segundos a uma rotação de 230 rpm.

4.4.2. Preparação das diluições decimais

Uma vez preparada a diluição primária, foram preparadas diluições decimais seriadas da suspensão inicial, de modo a obter o número apropriado de microrganismos para a contagem em meio de cultura sólido. Para tal, foram realizados ensaios prévios para que fosse possível estimar a diluição certa para as contagens pretendidas.

Assim, para a contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são válidas as placas que contenham entre 15 e 300 UFC (ISO 7889, 2003), correspondente às diluições de 10^{-6} a 10^{-8} e de 10^{-5} a 10^{-7} , respectivamente.

Para a contagem de bifidobactérias, são válidas as placas que contenham valores inferiores a 300 UFC (ISO 29981, 2010), correspondente às diluições de 10^{-4} a 10^{-6} .

Esta metodologia consiste em adicionar 1 ml da suspensão inicial a 9 ml de diluente BPW preparando assim a diluição 10^{-2} . A partir desta, é preparada de igual modo a diluição 10^{-3} e assim sucessivamente, tal como ilustra a figura 4.1.

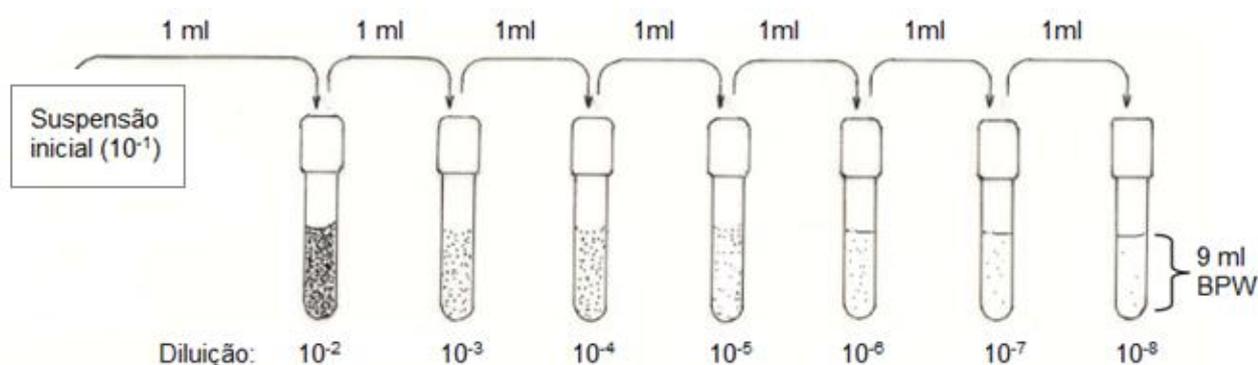


Figura 4.1: Diluições decimais de uma cultura microbiana a partir de uma suspensão inicial.

4.4.3. Inoculação e Incubação

4.4.3.1. Controlo da qualidade do meio de cultura

Para garantir a qualidade dos resultados microbiológicos, é necessário manter a esterilidade dos meios de cultura. Desta forma, foi realizado um controlo de cada meio de cultura utilizado no presente trabalho, vertendo cada meio para uma placa de Petri esterilizada, devidamente numerada. As placas foram colocadas na estufa de incubação (Binder®), juntamente com placas contendo o inóculo do meio corresponde.

4.4.3.2. Inóculo e incubação para contagem de *S. thermophilus*

Antes de proceder-se à inoculação propriamente dita, preparou-se o meio M17-Lactose que será colocado na placa de Petri contendo o inóculo. Para tal, adicionou-se 5 ml da solução de lactose 10% a 95 ml de meio M17, previamente aquecido no banho de água (Raypa®, modelo Termostatic Bath) a 45 °C.

A inoculação para a enumeração de *S. thermophilus* foi realizada através da técnica *pour-plate*, ou seja, transferiu-se 1 ml de cada diluição desejada (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) para três placas de Petri esterilizadas, previamente identificadas, com a ajuda de um pipetador automático (VitLab-pipeo®) e de uma pipeta graduada esterilizada de 5 ml.

Adicionou-se cerca de 15 ml de meio M17-Lactose, previamente aquecido no banho de água (Raypa®, modelo Termostatic Bath) a 45 °C, para cada uma das placas de Petri, agitou-se as placas delicadamente e deixou-se o meio solidificar.

Por fim, colocaram-se as placas, em conjuntos de 6 e invertidas, na estufa (Binder®) a 37 °C durante 48 horas.

4.4.3.3. Inóculo e incubação para contagem de *L. bulgaricus*

A inoculação para a enumeração de *L. bulgaricus* foi realizada através do método *pour-plate*, transferindo 1 ml de cada diluição desejada (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) para três placas de Petri esterilizadas, previamente identificadas, com a ajuda de um pipetador automático (VitLab-pipeo®) e de uma pipeta graduada esterilizada de 5 ml.

Em seguida, adicionou-se cerca de 15 ml de meio MRS, previamente aquecido no banho de água (Raypa®, modelo Termostatic Bath) a 45 °C, para cada uma das placas de Petri, agitou-se as placas delicadamente e deixou-se o meio solidificar.

Por fim, colocaram-se as placas numa jarra de anaerobiose (Merck®) com o gerador de microaerofilia Anaerocult C (Merck®), na estufa (Merck®) a 37 °C durante 72 horas.

4.4.3.4. Inóculo e incubação para contagem de bifidobactérias

NOTA: O tempo entre a preparação da diluição primária até a adição do meio de cultura não deverá exceder os 15 minutos.

Antes de proceder-se à inoculação propriamente dita, preparou-se o meio TOS-MUP que será colocado na placa de Petri contendo o inóculo. Para tal, adicionou-se 10 ml de MUP a 190 ml de meio TOS, previamente aquecido no banho de água (Raypa®, modelo Termostatic Bath) a 45 °C.

A inoculação para a enumeração de bifidobactérias foi realizada através da técnica *pour-plate*, ou seja, transferiu-se 1 ml de cada diluição desejada (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) para três placas de Petri esterilizadas, previamente identificadas, com o auxílio de um pipetador automático (VitLab-pipeo®) e de uma pipeta graduada esterilizada de 5 ml.

Adicionou-se aproximadamente 15 ml de meio TOS-MUP, previamente aquecido no banho de água (Raypa®, modelo Termostatic Bath) a 45 °C, para cada uma das placas de Petri, agitou-se as placas delicadamente e deixou-se o meio solidificar. Por fim, colocaram-se as placas numa jarra de anaerobiose (Merck®), em conjuntos de 10 e invertidas, com o gerador de anaerobiose Anaerocult A (Merck®), na estufa (Merck®) a 37 °C durante 72 horas.

4.5. Testes de Confirmação

Segundo a norma ISO 7889:2003, é necessário realizar testes de confirmação das colónias de *L. bulgaricus* e de *S. thermophilus*, sendo estes o teste de coloração de Gram e o teste de catalase. Contudo, o teste de coloração de Gram não foi realizado no decorrer do presente trabalho, uma vez que a empresa SGS Portugal, S.A. não realiza este teste na sua rotina de análises laboratoriais, sendo substituído pelo teste do hidróxido de potássio (KOH).

O teste do hidróxido de potássio consiste em adicionar duas gotas de uma solução de KOH a 3% numa placa de Petri esterilizada e, com o auxílio de uma ansa, colecta-se uma colónia isolada da bactéria a ser estudada e mistura-se com a solução de KOH, durante 30 segundos. Durante a mistura, eleva-se a ansa várias vezes cerca de 1 a 2 cm da superfície da lâmina. Se, ao levantar a ansa, observar-se a formação de um fio viscoso a reacção é positiva, indicando a presença dum microrganismo Gram-negativo. Isto deve-se ao facto da parede celular das bactérias Gram-negativas romper-se facilmente quando em contacto com uma solução de KOH. Os restos de DNA libertados permanecem agregados na suspensão, apresentando a formação de um filamento viscoso (Gregerson, 1978; Halebian *et al.*, 1981).

O teste da catalase consiste na transferência de uma colónia em estudo para uma placa de Petri esterilizada e, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, adiciona-se uma gota de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a 3%. Se observar-se a formação de bolhas de ar, a reacção é positiva, indicando a presença de um microrganismo catalase positiva. Isto deve-se ao facto da enzima catalase reagir com o peróxido de hidrogénio, decompondo-o em água e oxigénio ($2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$) (Harvey *et al.*, 2007).

Já a confirmação de bifidobactérias, segundo a norma ISO 29981:2010, levou em consideração as colónias características que apresentam uma coloração branca brilhante e um odor típico a azedo, devido à produção de ácido acético e láctico.

4.6. Cálculo das contagens da flora específica e de bifidobactérias

4.6.1. Cálculo da contagem da flora específica

Depois da incubação, contam-se as colónias características de *S. thermophilus* e de *L. bulgaricus*, em meio de cultura específico, escolhendo para esse efeito as placas de Petri correspondentes à diluição em que o número total de colónias não seja inferior a 15 nem superior a 300. O número total de microrganismos característicos da flora específica do iogurte, por grama de iogurte, é dado pela expressão **(1)**, expresso por um número compreendido entre 1,0 e 9,9 multiplicando por 10^n , sendo n a potência apropriada de 10 (ISO 7889, 2003):

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \quad (1)$$

Sendo,

$\sum C$ o somatório de colónias contadas nas placas de Petri em que o número total de colónias esteja compreendido entre 15 e 300 CFU;

n_1 o número de placas de Petri correspondentes à primeira diluição em que o número total de colónias esteja compreendido entre 15 e 300 CFU;

n_2 o número de placas de Petri correspondentes à segunda diluição em que o número total de colónias esteja compreendido entre 15 e 300 CFU;

d o factor de diluição correspondente à primeira diluição contável.

O número total de microrganismos característicos da flora específica do iogurte, por grama de iogurte, é dado pela expressão **(2)**:

$$N_{\text{Flora}} = N_{S. \text{ thermophilus}} + N_{L. \text{ bulgaricus}} \quad (2)$$

Onde,

$N_{S. \text{ thermophilus}}$ é o valor calculado correspondente à contagem de *S. thermophilus*, a partir da expressão (1);

$N_{L. \text{ bulgaricus}}$ é o valor calculado correspondente à contagem de *L. bulgaricus*, a partir da expressão (1).

4.6.2. Cálculo da contagem de bifidobactérias

Depois da incubação, contam-se as colónias características de bifidobactérias, em meio de cultura específico, escolhendo para esse efeito as placas de Petri correspondentes à diluição em que o número total de colónias não seja superior a 300.

O número total de bifidobactérias, por grama de iogurte, é dado pela expressão **(3)**, expresso por um número compreendido entre 1,0 e 9,9 multiplicando por 10^n , sendo n a potência apropriada de 10 (ISO 29981, 2010):

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2 + 0,01 n_3) d} \quad (3)$$

Sendo,

$\sum C$ o somatório de colónias contadas nas placas de Petri em que o número total de colónias seja igual ou inferior a 300 CFU;

n_1 o número de placas de Petri correspondentes à primeira diluição em que o número total de colónias seja igual ou inferior a 300 CFU;

n_2 o número de placas de Petri correspondentes à segunda diluição em que o número total de colónias seja igual ou inferior a 300 CFU;

n_3 o número de placas de Petri correspondentes à terceira diluição em que o número total de colónias seja igual ou inferior a 300 CFU;

d o factor de diluição correspondente à primeira diluição contável.

4.7. Validação da Metodologia

Um dos factores essenciais para prosseguir com acreditação de um laboratório, segundo o requisito 5.4.5 da norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, consiste na validação dos métodos de ensaio.

A validação de um método de ensaio consiste num processo pelo qual se analisa as características da performance do método, garantindo que os ensaios são sempre executados da mesma maneira, diminuindo significativamente as fontes de variabilidade. Assim, é possível garantir que a metodologia seguida é sempre a mesma, independentemente do técnico que realiza o ensaio.

Um laboratório pode validar métodos normalizados ou não normalizados, desde que adequados para a realização dos ensaios previstos. Contudo, em ambos os casos, terão de ser devidamente validados, visto que é essencial verificar se as condições do laboratório permitem obter resultados e precisão que possam ser aceites como adequadas.

Um método normalizado é um método de ensaio que segue o descrito numa norma de ensaio ou documento normativo equivalente, elaborado por um organismo de normalização (IPAC, 2015). Incluem-se neste tipo de métodos, métodos internacionalmente reconhecidos, tais como os da A.O.A.C., *Standard Methods*, para os quais, devem ser verificados os parâmetros fundamentais de validação, nas condições de execução e para os fins específicos de cada laboratório, de forma a

evidenciar a fiabilidade dos resultados obtidos. Estes métodos, devidamente validados, estão sujeitos a uma actualização periódica e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional e internacional.

A *Internacional Organization for Standardization* (ISO), fundada em 1947 e sediada em Genebra, é uma organização internacional de normalização com o objectivo de promover o desenvolvimento da normalização no mundo, para facilitar o intercâmbio internacional de bens e serviços, e é responsável pela publicação da maior parte dos referenciais normativos reconhecidos internacionalmente (ISO, 2015).

Hoje em dia, o estabelecimento de normas é imprescindível para garantir o padrão de qualidade e segurança nos diversos produtos, processos e/ou serviços. Desta forma, as normas ISO pretendem elevar os níveis de qualidade, segurança, fiabilidade e eficácia, não só para a satisfação e segurança do consumidor, mas também para proporcionar grandes vantagens às empresas.

Entre as várias vantagens da normalização destacam-se as seguintes: maior eficiência e segurança para o desenvolvimento, a produção e a distribuição dos produtos, através da utilização adequada de recursos, uniformidade do trabalho e melhoria da qualidade; facilidade nas transacções comerciais entre os vários países, uma vez que fornecem uma boa base técnica para a legislação em termos de saúde, segurança e ambiente; aumento do nível de fiabilidade; vantagens económicas para as empresas; segurança de pessoas e bens; protecção dos interesses do consumidor (ISO, 2015).

Porém, segundo o guia OGC001 para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025, publicado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), o grau de verificação/validação para um método normalizado deve ser menos exigente e exaustivo do que para métodos que tenham sofrido modificações da técnica ou que não estejam referidos na literatura científica e, como tal, considerados como métodos inovadores.

No presente trabalho, a validação da metodologia prevê a utilização de um método normalizado, baseado numa norma ISO, sem qualquer extensão ou modificação, pelo que neste caso é necessário evidenciar os registos que demonstrem a sua implementação em cumprimento com as características de desempenho do mesmo.

A fim de confirmar que os métodos são adequados à utilização prevista, o laboratório deve elaborar um relatório de validação/implementação onde deverá constar, no mínimo, a seguinte informação (IPAC, 2015):

- Experiência no método (número de determinações efectuadas, naturais ou contaminadas artificialmente), sendo recomendada a realização de 30 ensaios, dos quais no mínimo 10 positivos;
- Ensaios Intralaboratoriais (duplicados e ensaios em paralelo);
- Avaliação da incerteza, segundo o guia OGC005 (IPAC, 2006);
- Qualificação do analista para o método;
- Evidência de participação em, pelo menos, um ensaio interlaboratorial com resultados satisfatórios.

4.7.1. Ensaio Intralaboratorial – Controlo de Qualidade Interno

O Ensaio Intralaboratorial, também conhecido como Controlo de Qualidade Interno, consiste nas práticas efectuadas por um laboratório para a avaliação contínua do trabalho do mesmo. O objectivo principal é assegurar a consistência dos resultados no dia-a-dia e, a sua conformidade com os critérios definidos (Guia Relacre 6, 2007; IPAC, 2015).

É necessário um programa de verificações periódicas para demonstrar que a variabilidade (entre analistas e entre equipamentos ou materiais) está sob controlo. Esta periodicidade deve ser estabelecida, tendo em consideração a experiência do pessoal, o volume de ensaios e as condições de instalação (IPAC, 2015).

Para efeitos de garantia da qualidade dos resultados do laboratório, os dados obtidos deverão ser avaliados periodicamente e com recurso ao tratamento estatístico.

4.7.1.1. Critério de Precisão – Carta de Duplicados

Um dos métodos utilizados no laboratório da empresa SGS Portugal, S.A. para o Controlo de Qualidade Interno é a utilização de Cartas de Duplicados, a partir do cálculo do Critério de Precisão. Estas cartas são reavaliadas ao longo dos anos e servem também para avaliar o desempenho dos técnicos.

As Cartas de Duplicados são cartas que apresentam um limite superior (Critério de Precisão) calculado por matriz na qual são marcados os valores estatísticos de medidas de amplitudes de duplicados (IPAC, 2015).

O principal objectivo do emprego deste tipo de ferramenta estatística é o de visualizar a evolução e controlar continuamente os resultados obtidos nos métodos que são praticados internamente.

Para calcular o Critério de Precisão (CP), deve-se converter cada par de duplicados (feitos pelo mesmo analista) em Log_{10} . Determina-se então valor da amplitude dos logaritmos (R Log) através da sua diferença dos valores dos logaritmos (IPAC, 2015):

$$R \text{ Log} = |\text{Log } X_{IA} - \text{Log } X_{IB}| \quad (4)$$

Finaliza-se com o cálculo da média dessas amplitudes, utilizando a seguinte expressão (IPAC, 2015):

$$\bar{R} = \frac{\sum R \text{ Log}}{n} \quad (5)$$

Por fim, o Critério de Precisão é calculado pela seguinte fórmula, cujo valor é usado como linha superior para verificar a variabilidade dos duplicados realizados em rotina, durante o ano, pelo mesmo analista (IPAC, 2015):

$$CP = \bar{R} \times 3,27 \quad (6)$$

4.7.1.2. Estimativa da Incerteza

Em 2006, o IPAC publicou o “Guia para a Estimativa de Incerteza em Ensaio Microbiológicos”, que se baseia na ISO 19036, com a finalidade de apoiar os laboratórios a quantificarem a Incerteza de medição através do cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade dos resultados dos ensaios efectuados.

O IPAC define a Incerteza como o parâmetro, associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda. O cálculo da Incerteza, para métodos quantitativos em microbiologia, pode ser feito através da estimativa experimental do desvio padrão da reprodutibilidade (S_R) do resultado final do ensaio de medição, valor que deve ser incluído no relatório de implementação de um método, mas tendo no mínimo 15 resultados de amostras realizadas em condições de reprodutibilidade. (IPAC, 2006).

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes lotes de cultura e reagentes/diluentes durante um intervalo de tempo alargado (Guia Relacre 13, 2000).

Os laboratórios que efectuam ensaios microbiológicos têm ou podem obter resultados de ensaio em paralelo, para as amostras analisadas, preferencialmente por diferentes analistas, com o objectivo de estimar a incerteza.

Portanto, para cada par de resultados, a diferença absoluta tem que ser inferior ao limite de reprodutibilidade (R) para verificar se a diferença entre os resultados obtidos por dois analistas é significativa. Este valor limite de reprodutibilidade representa o máximo de precisão possível, pelo que é expectável que o valor obtido pelo laboratório seja inferior.

O desvio padrão da reprodutibilidade (S_R) deve ser calculado com os dados do controlo de qualidade interno, ou seja, com os resultados dos ensaios efectuados em paralelo, em condições de reprodutibilidade, cujo número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) seja superior a 10.

A reprodutibilidade é expressa em termos de desvio padrão da reprodutibilidade (S_R), e é calculado, para cada amostra i , através da seguinte expressão (IPAC, 2006):

$$S_R = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{S_{Ri}^2}{n}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(Y_{iA} - Y_{iB})^2}{2.n}} \quad (7)$$

Sendo,

i o índice da amostra, $i = 1$ de n ($n \geq 10$);

A e B os índices das condições de reprodutibilidade;

Y são os resultados transformados em \log_{10} (UFC/g).

Obtém-se então o limite de reprodutibilidade (R) para as n amostras de uma dada matriz do seguinte modo (IPAC, 2006):

$$R = 2,8 \cdot \sqrt{S_R^2} \quad (8)$$

O limite de reprodutibilidade, é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições acima referidas (IPAC, 2006).

A Incerteza Expandida (U) é definida, segundo o IPAC, como a quantidade que define um intervalo de um resultado de uma medição no qual é esperado que inclua uma grande fracção da distribuição dos valores que podem razoavelmente ser atribuídos à mensuranda, e deverá ser calculada através da seguinte fórmula (IPAC, 2006):

$$U = k \cdot \sqrt{S_R^2} \quad (9)$$

Onde,

$k = 2$ (a um nível de confiança de 95%, de acordo com a tabela de t de Student) é factor de expansão, usado como um multiplicador da incerteza combinada de modo a obter a incerteza expandida.

A Incerteza pode ser expressa como um intervalo de Log_{10} , em valores naturais (número de UFC), e não devem ser usados mais do que dois algarismos significativos para reportar o intervalo da Incerteza. Desta forma, o resultado da análise pode ser expresso da seguinte maneira (IPAC, 2006):

$$x \text{ UFC/g ou UFC/ml } [10^{y-2.SR} ; 10^{y+2.SR}] \quad (10)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo, são apresentados todos os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento experimental desta dissertação, assim como o seu tratamento e devida discussão.

A contagem da flora específica do iogurte foi realizada através do método de sementeira por incorporação em placas de Petri contendo os meios de cultura apropriados, incubação a 37 °C, e posteriormente contagem dos microrganismos presentes nas placas. As figuras 5.1 e 5.2 mostram as placas contendo colónias de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, respectivamente, após o período de incubação.

Para a confirmação das colónias de *S. thermophilus* e de *L. bulgaricus* foram realizados dois testes: o teste do hidróxido de potássio e o teste da catalase, cujos resultados são apresentados nas figuras 5.4 e 5.5, respectivamente.

A tabela 5.1 apresenta os valores das contagens dos microrganismos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, assim como o valor médio da flora específica do iogurte, em 20 amostras de iogurtes, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g).

A contagem de bifidobactérias foi realizada através da técnica de sementeira por incorporação em placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado, incubação a 37 °C, em condições de anaerobiose, e posterior contagem dos microrganismos presentes nas placas. A figura 5.3 mostra as placas contendo colónias de bifidobactérias, após o período de incubação.

Na tabela 5.2 são apresentados os resultados obtidos nas contagens de bifidobactérias, em 20 amostras de iogurte, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g). Contudo, 5 das 20 amostras não apresentam resultados positivos, pelo que não serão trabalhadas estatisticamente.

Para efeitos de garantia da qualidade dos resultados, os dados obtidos foram avaliados com recurso ao tratamento estatístico. Para tal, foram analisados parâmetros como o Critério de Precisão (CP), o limite de reprodutibilidade (R) e a Incerteza Expandida (*U*).

As tabelas 5.3 e 5.4 apresentam os valores que contribuíram para o cálculo do Critério de Precisão, para a flora específica do iogurte e para as bifidobactérias, respectivamente, com base no Guia OGC00XX (IPAC, 2015). A partir destes cálculos foi possível construir as Cartas de Duplicados, para a flora específica do iogurte (figura 5.6) e para as bifidobactérias (figura 5.7), de modo a verificar se os valores obtidos são, ou não, aceites e se estão abaixo do limite do Critério de Precisão, como é de esperar.

As tabelas 5.5 e 5.6 apresentam os valores que contribuíram para o cálculo do limite de Reprodutibilidade (R) e da Incerteza Expandida (*U*), para a flora específica do iogurte e para as bifidobactérias, respectivamente, com base no Guia OGC005 (IPAC, 2006).

Por fim, é apresentada a discussão de todos os resultados obtidos.

5.1. Contagem de colónias

5.1.1. Contagem de *S. thermophilus*

Segundo a norma ISO 7889:2003, são válidas as placas contendo entre 15 a 300 UFC, como foi referido anteriormente. Estas células (figura 5.1) apresentam formas esféricas ou ovais, cujas dimensões variam entre 0,2 a 1,2 μm .

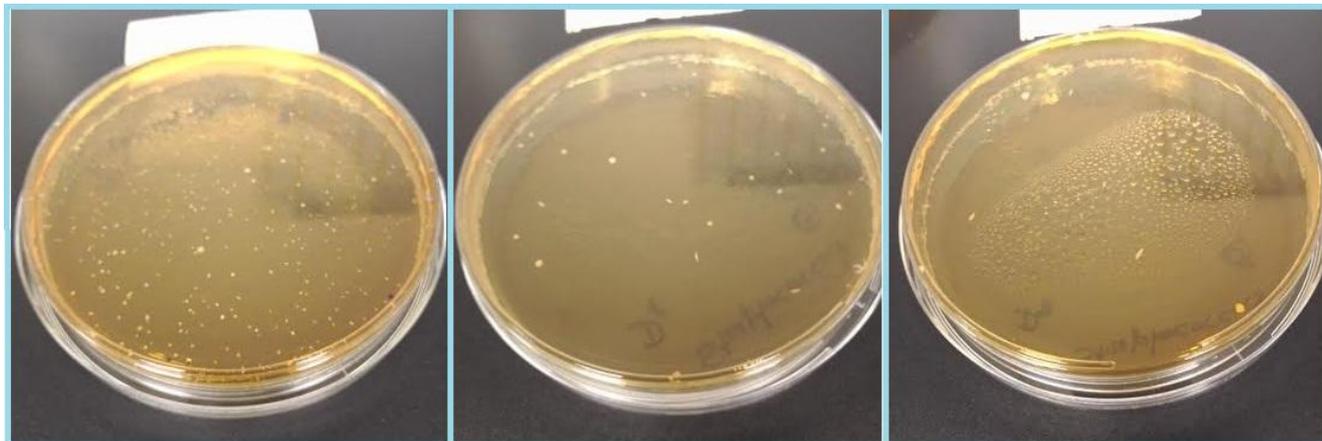


Figura 5.1: Da esquerda para a direita apresentam-se as placas de meio M17 contendo colónias de *S. thermophilus*, após incubação, correspondentes às diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} .

5.1.2. Contagem de *L. bulgaricus*

Segundo a norma ISO 7889:2003, são válidas as placas contendo entre 15 a 300 UFC, como foi referido anteriormente. Estas células (figura 5.2) apresentam formas de bastonetes regulares, de cor esbranquiçada, com cerca de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro.



Figura 5.2: Da esquerda para a direita apresentam-se as placas de meio MRS, correspondentes às diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , contendo colónias de *L. bulgaricus*, após incubação.

5.1.3. Contagem de bifidobactérias

Segundo a norma ISO 29981:2010, são válidas as placas que contenham valores iguais ou inferiores a 300 UFC, como foi referido anteriormente. Estas células (figura 5.3) apresentam formas de bastonetes curtos e curvados a bacilos bifurcados (Holt *et al.*, 1994), de cor esbranquiçada brilhante, com cerca de 0,2 a 0,6 mm de diâmetro.

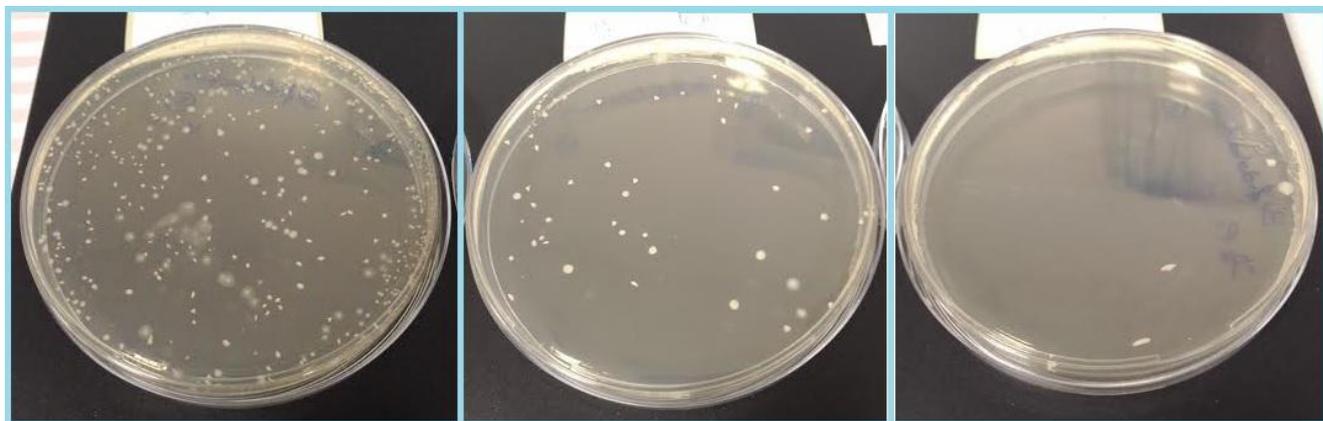


Figura 5.3: Da esquerda para a direita apresentam-se as placas de meio TOS-MUP contendo colónias de bifidobactérias, após incubação, correspondentes às diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .

5.2. Resultados dos Testes de Confirmação

5.2.1. Resultado do teste do hidróxido de potássio

O teste do hidróxido de potássio é um teste rápido e de fácil utilização que distingue as bactérias Gram-negativas das Gram-positivas. A parede celular das bactérias Gram-negativas é facilmente rompida quando em contacto com soluções alcalinas diluídas, e os restos de DNA libertados permanecem agregados na suspensão, apresentando a formação de um filamento viscoso.



Figura 5.4: Teste de hidróxido de potássio: mistura de uma colónia de um microrganismo característico da flora específica do iogurte com uma solução de KOH a 3%.

As bactérias em estudo são Gram-positivas, pelo que não se observou a formação de um fio viscoso (figura 5.4), uma vez que a parede celular é mais resistente e não é rompida quando em contacto com uma solução de KOH (Gregerson, 1978; Halebian *et al.*, 1981).

5.2.2. Resultado do teste da catalase

O teste da catalase é também um teste rápido e de fácil utilização e é baseado na presença da enzima catalase que reage com o peróxido de hidrogénio, decompondo-o em água e oxigénio. A libertação do oxigénio observa-se pela formação de bolhas de ar, indicando a presença dum microrganismo catalase positiva (Harvey *et al.*, 2007).

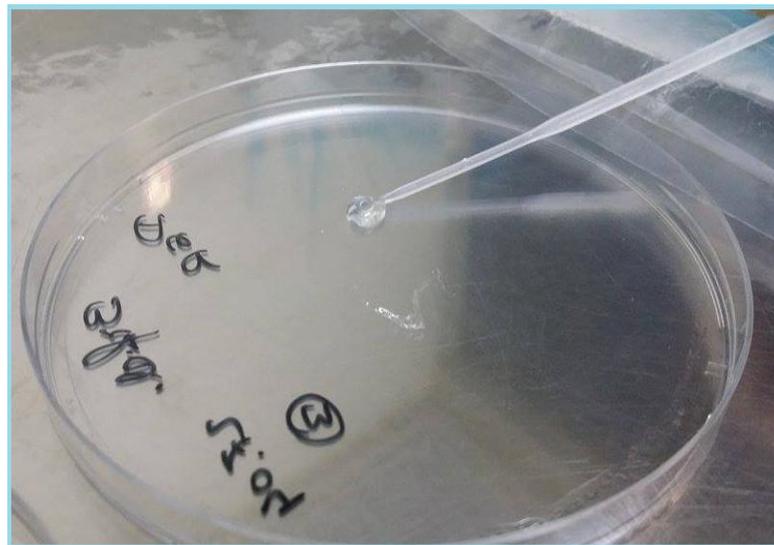


Figura 5.5: Teste da catalase: mistura de uma colónia de um microrganismo característico da flora específica do iogurte com uma solução de peróxido de hidrogénio a 3%.

As bactérias em estudo são catalase negativa, pelo que não se observou a formação de bolhas de ar quando em contacto com o peróxido de hidrogénio (figura 5.5).

5.3. Resultados das contagens da flora específica e discussão

Tabela 5.1: Resultados obtidos nas contagens de *S. thermophilus* ($N_{S. thermophilus}$) e de *L. bulgaricus* ($N_{L. bulgaricus}$) nas diluições de 10^{-5} a 10^{-8} , e da flora específica do iogurte (N_{Flora}), em 20 amostras de iogurtes, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g).

Amostra	<i>S. thermophilus</i> (UFC)			$N_{S. thermophilus}$ (UFC/g)	<i>L. bulgaricus</i> (UFC)			$N_{L. bulgaricus}$ (UFC/g)	N_{Flora} (UFC/g)	N_{Flora} Médio (UFC/g)	N_{Flora} Médio Log (UFC/g)	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}					
A	A.1	484	68	9	$7,1 \times 10^8$	Não cresceram			--	$7,1 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$	8,85
		508	77	9								
		504	67	6								
	A.2	456	94	13	$9,7 \times 10^8$	Não cresceram			--	$9,7 \times 10^8$		
		460	95	10								
		496	96	17								
	A.3	584	64	6	$6,5 \times 10^8$	Não cresceram			--	$6,5 \times 10^8$		
		588	63	8								
		476	69	5								
	A.4	455	45	6	$4,9 \times 10^8$	Não cresceram			--	$4,9 \times 10^8$		
		469	56	8								
		468	46	7								
B	B.1	440	93	13	$8,4 \times 10^8$	Não cresceram			--	$8,4 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	8,86
		468	86	12								
		420	74	14								
	B.2	532	76	5	$7,4 \times 10^8$	Não cresceram			--	$7,4 \times 10^8$		
		432	79	4								
		428	67	4								
	B.3	416	47	7	$5,4 \times 10^8$	Não cresceram			--	$5,4 \times 10^8$		
		412	56	9								
		428	59	9								
	B.4	448	80	12	$7,5 \times 10^8$	Não cresceram			--	$7,5 \times 10^8$		
		432	64	10								
			488	81	7							

Tabela 5.1: Resultados obtidos nas contagens de *S. thermophilus* ($N_{S. thermophilus}$) e de *L. bulgaricus* ($N_{L. bulgaricus}$) nas diluições de 10^5 a 10^8 , e da flora específica do iogurte (N_{Flora}), em 20 amostras de iogurtes, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g) (continuação).

Amostra	<i>S. thermophilus</i> (UFC)			$N_{S. thermophilus}$ (UFC/g)	<i>L. bulgaricus</i> (UFC)			$N_{L. bulgaricus}$ (UFC/g)	N_{Flora} (UFC/g)	N_{Flora} Médio (UFC/g)	N_{Flora} Médio Log (UFC/g)	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}					
C	C.1	356	39	3	$3,7 \times 10^8$	Não cresceram			--	$3,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	8,54
		324	43	5								
		316	28	3								
	C.2	356	43	6	$3,2 \times 10^8$	Não cresceram			--	$3,2 \times 10^8$		
		300	35	2								
		312	36	5								
	C.3	324	54	5	$4,4 \times 10^8$	Não cresceram			--	$4,4 \times 10^8$		
		316	43	3								
		324	36	3								
	C.4	276	24	3	$2,8 \times 10^8$	Não cresceram			--	$2,8 \times 10^8$		
		316	34	7								
		288	32	7								
D	D.1	288	57	9	$2,9 \times 10^8$	Não cresceram			--	$2,9 \times 10^8$		
		300	42	4								
		240	37	5								
	D.2	296	50	6	$5,8 \times 10^8$	Não cresceram			--	$5,8 \times 10^8$		
		299	53	6								
		352	58	5								
	D.3	280	62	7	$3,1 \times 10^8$	Não cresceram			--	$3,1 \times 10^8$		
		272	57	6								
		300	53	5								
	D.4	268	44	4	$2,7 \times 10^8$	Não cresceram			--	$2,7 \times 10^8$		
		240	38	5								
		264	41	5								

Tabela 5.1: Resultados obtidos nas contagens de *S. thermophilus* ($N_{S. thermophilus}$) e de *L. bulgaricus* ($N_{L. bulgaricus}$) nas diluições de 10^{-5} a 10^{-8} , e da flora específica do iogurte (N_{Flora}), em 20 amostras de iogurtes, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g) (continuação).

Amostra	<i>S. thermophilus</i> (UFC)			$N_{S. thermophilus}$ (UFC/g)	<i>L. bulgaricus</i> (UFC)			$N_{L. bulgaricus}$ (UFC/g)	N_{Flora} (UFC/g)	N_{Flora} Médio (UFC/g)	N_{Flora} Médio Log (UFC/g)	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}					
E	E.1	208	23	2	$2,4 \times 10^8$	155	26	3	$1,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	8,40
		260	26	4		136	13	3				
		264	22	2		144	15	5				
	E.2	260	31	4	$2,4 \times 10^8$	85	9	1	$7,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^8$		
		236	28	6		72	6	1				
		204	22	5		67	9	0				
	E.3	180	29	2	$1,9 \times 10^8$	160	20	1	$1,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$		
		160	28	2		120	19	2				
		204	21	1		168	17	2				
	E.4	228	26	5	$2,6 \times 10^8$	300	31	4	$2,7 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$		
		244	39	3		236	24	2				
		268	38	3		304	21	3				

A tabela 5.1 apresenta os resultados das contagens totais da flora específica do iogurte, em 20 amostras de iogurtes, obtendo-se o valor médio de $4,8 \times 10^8$ UFC/g de produto, sendo o valor mínimo de $2,5 \times 10^8$ UFC/g e o valor máximo de $7,2 \times 10^8$ UFC/g. Estes valores vão de encontro com os valores estabelecidos pela legislação portuguesa em vigor, onde a contagem da flora específica do iogurte, com vitalidade própria, deve ser no mínimo de 5×10^7 UFC/g (Portaria nº 742/92). Já a FAO/WHO, segundo o Codex Stan 243-2003, e a legislação brasileira, segundo os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução Nº 5 de 13 de novembro de 2000, indicam que a contagem total de bactérias lácteas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/g no produto final, durante todo o prazo de validade.

Apesar de não se ter verificado crescimento de *L. bulgaricus* nas amostras A, B, C e D, os resultados obtidos das contagens da flora específica do iogurte estão de acordo com os padrões recomendados pela legislação portuguesa em vigor, uma vez que a mesma não apresenta resultados da contagem dos microrganismos em separado.

Como foi dito anteriormente no capítulo 2 desta dissertação, a proporção entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* é de extrema importância para o desenvolvimento do *flavour* do iogurte. Segundo Pette e Lolkema (1950), para se desenvolver um *flavour* apropriado, o rácio entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* deverá estar na gama de 1:1 a 3:1. Porém, o crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* promove a pós-acidificação do iogurte (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001). Para evitar esta pós-acidificação, as indústrias fabricantes de culturas lácteas fornecem culturas tradicionais de iogurte com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*. A redução da concentração de *L. bulgaricus* no iogurte contribui para a diminuição da pós-acidificação do produto durante a sua vida de prateleira. Isto é importante tanto para garantir ao produto final um sabor suave, como para evitar efeitos adversos do pH baixo sobre as bactérias probióticas (Dave e Shah, 1997; Kneifel *et al.*, 1992), sendo uma possível justificação para o facto de não terem sido detectadas colónias de *L. bulgaricus* nas amostras A, B, C e D, e por ter-se obtido um resultado superior nas contagens de *S. thermophilus* em comparação com os resultados das contagens de *L. bulgaricus* na amostra E, no presente trabalho.

Já a norma ISO 7889:2003, conclui que os *L. bulgaricus*, quando crescem em condições de anaerobiose no iogurte, não podem ser enumerados no meio MRS Agar. Quando este problema ocorre, a técnica de inoculação das colónias pode ser substituída usando o meio LBA (Laked Blood Agar), desenvolvido pela NIZO Food Research, e posterior incubação a $50 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ durante 72 horas.

Na amostra E, os resultados das contagens de *S. thermophilus* foram superiores em comparação aos resultados das contagens de *L. bulgaricus*. De acordo com a literatura consultada, vários são os autores que obtiveram resultados de contagens de *S. thermophilus* superiores às contagens de *L. bulgaricus*, em iogurtes inoculados com a proporção inicial entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* de 1:1. Os valores obtidos no presente trabalho para a proporção entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são de 14:1 ($2,3 \times 10^8$: $1,6 \times 10^7$ UFC/g). Contudo, apesar desta proporção elevada, estes resultados são semelhantes aos obtidos por Kristo, Biliaderis e Tzanetakis (2003).

Considerando que as placas utilizadas no presente trabalho, contendo as colónias de microrganismos característicos da flora específica do iogurte, foram a incubar a 37 °C, uma possível justificação para estes valores deve-se ao facto das colónias de *L. bulgaricus* não estarem na sua temperatura óptima de crescimento.

Segundo Radke-Mitchell e Sandine (1986), as temperaturas óptimas de crescimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* variam entre 35 a 42 °C e 43 a 46 °C, respectivamente. Já Breed *et al.* (1957) conclui que as temperaturas óptimas de crescimento variam entre 40 a 45°C para os *S. thermophilus* e entre 45 a 50°C para os *L. bulgaricus*.

Nos estudos realizados por Radke-Mitchell e Sandine (1986) e Tabasco *et al.*, (2007), estes obtiveram uma contagem superior de *S. thermophilus*, em comparação aos *L. bulgaricus*, a uma temperatura de 37 °C. No entanto, a 45 °C, os autores obtiveram uma contagem superior de *L. bulgaricus*, possivelmente devido a uma inibição dos *S. thermophilus* por se encontrarem a uma temperatura acima da sua temperatura óptima de crescimento. Já os autores Ashraf e Shah (2011) e Tharmaraj e Shah (2003) concluem que os *L. bulgaricus* desenvolvem-se melhor a 45 °C, em meio MRS, durante 72 horas, em condições de anaerobiose.

Neste contexto, para situações em que as colónias de *L. bulgaricus* crescem muito lentamente, a norma ISO 7889:2003 recomenda o aumento do período de incubação de 72 horas para 5 a 6 dias (a 37 °C) ou uso de uma temperatura de incubação de 41 °C ± 1°C durante 72 horas ou de 45 °C durante 48 horas, em condições de anaerobiose.

A adição de diferentes sabores tem vindo a ser utilizada durante muito tempo pela indústria dos lacticínios, com o intuito de melhorar as características sensoriais do iogurte, levando a um aumento das escolhas dos consumidores, e, conseqüentemente, ao aumento da comercialização de iogurte.

Segundo Tamine (2006), a contagem das bactérias característicos da flora específica do iogurte aromatizado é, em muitos casos, inferior do que no iogurte natural, uma vez que o pH é mais baixo, comprometendo, desta forma, a viabilidade das bactérias.

No presente trabalho, verificou-se que o aroma do iogurte, seja ele natural ou aromatizado, não teve qualquer influência no crescimento dos microrganismos característicos da flora específica do iogurte, uma vez que não existe uma diferença significativa nos resultados médios da enumeração da flora específica do mesmo. Isto é, as amostras A (iogurte sólido natural) e B (iogurte sólido aroma morango), da mesma marca, obtiveram valores médios da contagem da flora específica do iogurte de $7,1 \times 10^8$ e $7,2 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente. O mesmo acontece para as amostras C (iogurte sólido natural) e D (iogurte sólido aroma morango), da mesma marca, que obtiveram valores médios da contagem da flora específica do iogurte de $3,5 \times 10^8$ e $3,6 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente.

5.4. Resultados das contagens das bifidobactérias e discussão

Tabela 5.2: Resultados obtidos nas contagens de bifidobactérias, nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , em 20 amostras de iogurtes, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g).

Amostra	Bifidobactéria (UFC)			N _{Bifidobactéria} (UFC/g)	N _{Bifidobactéria Médio} (UFC/g)	N _{Bifidobactéria Médio Log} (UFC/g)	
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}				
F	Não cresceram			--	--	--	
G	G.1	484	51	7	$5,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	6,66
		436	52	5			
		416	47	8			
	G.2	361	42	1	$3,8 \times 10^6$		
		345	36	3			
		414	43	1			
	G.3	398	57	5	$4,5 \times 10^6$		
		374	45	4			
		375	32	5			
	G.4	464	56	8	$5,0 \times 10^6$		
		449	45	5			
		415	44	6			
H	H.1	>300	236	33	$2,8 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	7,32
		>300	172	22			
		>300	232	35			
	H.2	>300	176	19	$1,9 \times 10^7$		
		>300	190	22			
		>300	182	21			
	H.3	>300	166	18	$1,7 \times 10^7$		
		>300	152	17			
		>300	178	21			
	H.4	>300	188	23	$1,9 \times 10^7$		
		>300	190	25			
		>300	171	20			
I	I.1	Não cresceram			--	$4,1 \times 10^6$	6,61
	I.2	337	55	6	$5,8 \times 10^6$		
		345	61	8			
		353	53	7			
	I.3	453	54	6	$4,8 \times 10^6$		
		414	42	5			
		425	45	5			
	I.4	408	60	7	$5,8 \times 10^6$		
		456	52	5			
		456	62	5			

Tabela 5.2: Resultados obtidos nas contagens de bifidobactérias, nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , em 20 amostras de iogurte, expressos em UFC/g e em Log (UFC/g) (continuação).

Amostra	Bifidobactéria (UFC)			N Bifidobactéria (UFC/g)	N Bifidobactéria Médio (UFC/g)	N Bifidobactéria Médio Log (UFC/g)	
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}				
J	J.1	320	38	7	$4,8 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	6,64
		355	55	8			
		365	46	5			
	J.2	348	54	3	$4,0 \times 10^6$		
		324	38	4			
		364	30	3			
	J.3	388	40	4	$4,3 \times 10^6$		
		316	43	5			
		372	47	4			
	J.4	417	51	7	$4,5 \times 10^6$		
		414	43	4			
		413	41	3			

A tabela 5.2 apresenta os resultados das contagens de bifidobactérias viáveis, em 20 amostras de iogurtes, cujos valores estão entre 0 e $2,8 \times 10^7$ UFC/g de produto. Das 20 amostras de iogurtes probióticos analisadas, apenas 15 obtiveram resultados positivos, alcançando um valor médio de $9,0 \times 10^6$ UFC/g, sendo o valor mínimo de $3,8 \times 10^6$ e o valor máximo de $2,8 \times 10^7$ UFC/g. Estes valores vão de encontro aos valores estabelecidos pela legislação portuguesa em vigor, onde a contagem total de bifidobactérias viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g de iogurte, durante todo o prazo de validade do produto (Portaria nº 742/92). O mesmo se verifica nos estudos realizados por Kurmann e Rasic (1991), pela FAO, segundo o Codex Stan 243-2003, e pela legislação brasileira, segundo os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução Nº 5 de 13 de novembro de 2000.

Segundo alguns autores, um iogurte probiótico para ser terapêuticamente eficaz, deve conter no mínimo 10^6 UFC/g de bactérias probióticas inoculadas, durante todo o prazo de validade (Arunachalam, 1999; Ashraf e Shah 2011; Kamila, 2012; Lourens-Hatting e Viljoen, 2001; Kailasapathy e Rybka, 1997; Kurmann e Rasic, 1991; Matilla-Sandholm *et al.*, 2002; Samona e Robinson, 1994).

Apesar das bifidobactérias estarem a ser cada vez mais reconhecidas como microrganismos benéficos para a saúde humana, estas ainda apresentam um desafio tecnológico para a indústria agro-alimentar. As bactérias probióticas deverão apresentar vários requisitos básicos para o desenvolvimento de produtos probióticos comercializáveis, incluindo a sua sobrevivência, actividade e estabilidade durante o armazenamento dos mesmos. Além disso, os probióticos não devem afectar negativamente o sabor ou aroma do produto nem promover a acidificação do mesmo, durante todo o seu tempo de prateleira (Donkor *et al.*, 2006).

A sobrevivência destas bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados depende de vários factores, tais como: a estirpe utilizada, concentração inoculada, interacção entre as espécies

presentes, conteúdo de sólidos do leite, disponibilidade de nutrientes, concentração de ácido láctico, ácido acético e de peróxido de hidrogénio resultantes do metabolismo microbiano, concentração de açúcar, acumulação de ácidos orgânicos devido ao crescimento microbiano durante a fermentação do leite, promotores e inibidores de crescimento, pH, oxigénio dissolvido, temperatura de incubação, tempo e temperatura de armazenamento, entre outros (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001; Kailasapathy e Rybka, 1997; Kamila, 2012; Saccaro *et al.*, 2012).

Diferentes perspectivas têm vindo a ser utilizadas com o objectivo de solucionar a sobrevivência dos organismos probióticos, tais como o uso de culturas seleccionadas, a microencapsulação e a adição de prebióticos (Donkor *et al.*, 2006, Matilla-Sandholm *et al.*, 2002).

A microencapsulação consiste na imobilização das células bacterianas no interior de uma matriz encapsulante, formando uma cápsula que deverá ser capaz de manter a sua integridade durante a passagem pelo tracto gastrointestinal (Kamila, 2012).

O termo prebiótico refere-se aos componentes presentes nos alimentos, não digestíveis, que ajudam o crescimento de microrganismos probióticos e/ou a sua acção no sistema digestivo (Matilla-Sandholm *et al.*, 2002). A associação de um prebiótico a um probiótico gera outra classe de alimento funcional, denominada de alimento simbiótico. Esta associação é vantajosa pois adapta a bactéria probiótica ao seu substrato, levando a uma vantagem competitiva desta bactéria (Matilla-Sandholm *et al.*, 2002; Tamine, 2006).

Os compostos prebióticos que têm sido amplamente utilizados são a inulina, fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos, lactulose, lactitol, lactosacarose e rafinose (Akalin *et al.*, 2004; Aryana e McGrew, 2007; Lidon e Silvestre, 2010).

Contudo, o efeito da interacção entre probióticos e prebióticos no iogurte ainda é um tema em aberto e controverso. Para alguns autores, um prebiótico é descrito como aquele que tem um efeito positivo sobre os probióticos, em termos de crescimento e capacidade de sobrevivência (Aryana e McGrew, 2007), enquanto que para outros, um prebiótico não apresenta qualquer efeito positivo sobre os probióticos (Allgeyer *et al.*, 2010). Assim, a adição, ou não, de prebióticos no produto dependerá do objectivo do fabricante, uma vez que o emprego destes, em certos géneros alimentícios, aumenta os seus custos de produção.

5.5. Cálculo de Critério de Precisão

5.5.1. Flora Específica

Tabela 5.3: Cálculo do Critério de Precisão (CP), para a flora específica do iogurte, com base no Guia OGC00XX (IPAC, 2015).

Amostra	X_{iA}	X_{iB}	$Y_{iA} = \text{Log}_{10}(X_{iA})$	$Y_{iB} = \text{Log}_{10}(X_{iB})$	R Log	n	$\bar{R} = \frac{\sum R \text{Log}}{n}$	CP	Aceitação (*)
A1 / Duplicado	$6,80 \times 10^8$	$7,70 \times 10^8$	8,833	8,886	0,055	20	0,054	0,177	Aceita
A2 / Duplicado	$9,40 \times 10^8$	$9,50 \times 10^8$	8,973	8,978	0,005				Aceita
A3 / Duplicado	$6,40 \times 10^8$	$6,30 \times 10^8$	8,806	8,799	0,007				Aceita
A4 / Duplicado	$4,50 \times 10^8$	$5,60 \times 10^8$	8,653	8,748	0,095				Aceita
B1 / Duplicado	$9,30 \times 10^8$	$8,60 \times 10^8$	8,968	8,934	0,034				Aceita
B2 / Duplicado	$7,60 \times 10^8$	$7,90 \times 10^8$	8,881	8,898	0,017				Aceita
B3 / Duplicado	$4,70 \times 10^8$	$5,60 \times 10^8$	8,672	8,748	0,076				Aceita
B4 / Duplicado	$8,00 \times 10^8$	$6,40 \times 10^8$	8,903	8,806	0,097				Aceita
C1 / Duplicado	$3,90 \times 10^8$	$4,30 \times 10^8$	8,591	8,633	0,042				Aceita
C2 / Duplicado	$4,30 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$	8,633	8,491	0,142				Aceita
C3 / Duplicado	$5,40 \times 10^8$	$4,30 \times 10^8$	8,732	8,633	0,099				Aceita
C4 / Duplicado	$2,70 \times 10^8$	$3,40 \times 10^8$	8,431	8,531	0,100				Aceita
D1 / Duplicado	$3,10 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$	8,491	8,491	0,000				Aceita
D2 / Duplicado	$3,20 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$	8,505	8,491	0,014				Aceita
D3 / Duplicado	$3,10 \times 10^8$	$3,00 \times 10^8$	8,491	8,477	0,014				Aceita
D4 / Duplicado	$2,80 \times 10^8$	$2,50 \times 10^8$	8,447	8,398	0,049				Aceita
E1 / Duplicado	$2,10 \times 10^8$	$2,60 \times 10^8$	8,322	8,415	0,093				Aceita
E2 / Duplicado	$2,60 \times 10^8$	$2,40 \times 10^8$	8,415	8,380	0,035				Aceita
E3 / Duplicado	$1,90 \times 10^8$	$1,70 \times 10^8$	8,279	8,230	0,048				Aceita
E4 / Duplicado	$2,30 \times 10^8$	$2,60 \times 10^8$	8,362	8,415	0,053				Aceita

(*) Aceitável se a amplitude (R Log) for inferior ao Critério de Precisão (CP).

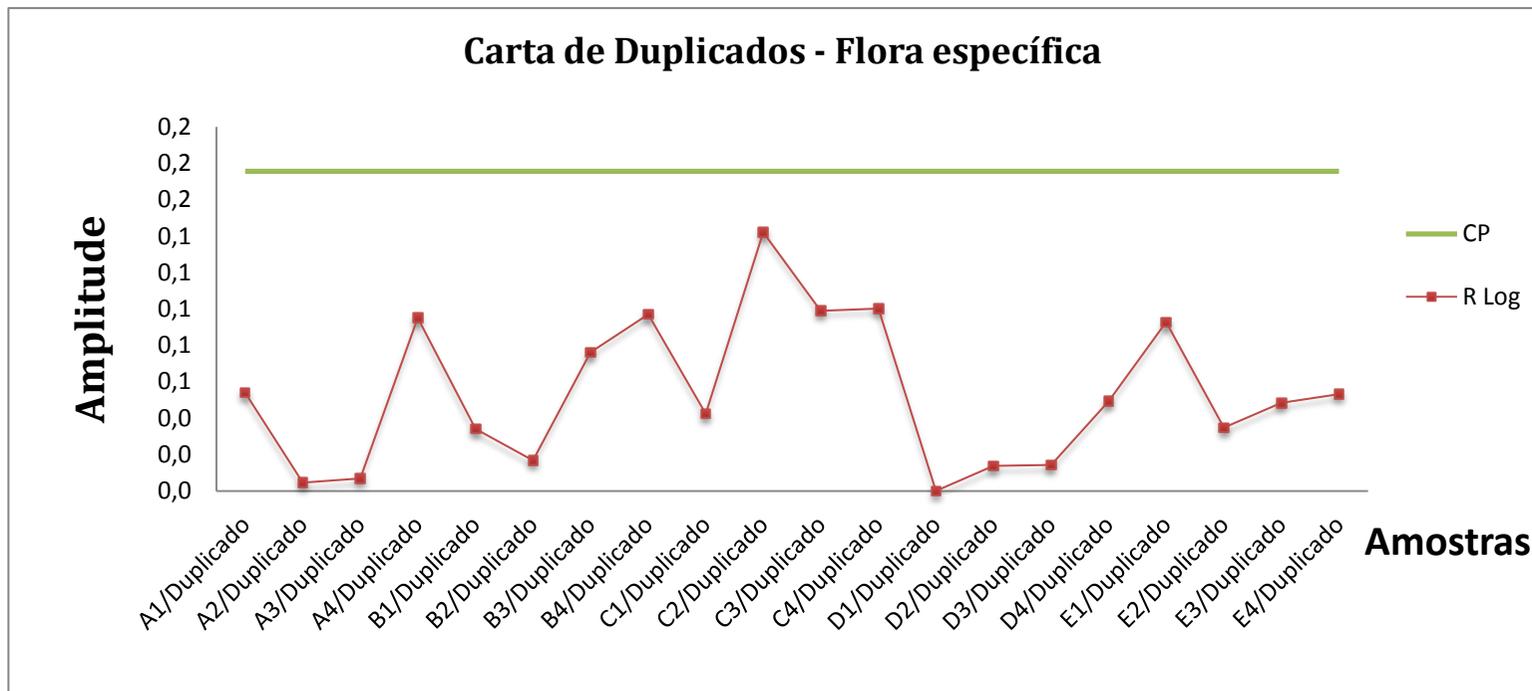


Figura 5.6: Carta de Duplicados correspondente às contagens de microrganismos característicos da flora específica do iogurte, em 20 amostras de iogurtes, sendo CP o critério de precisão e R Log a amplitude dos logaritmos dos duplicados.

5.5.2. Bifidobactérias

Tabela 5.4: Cálculo do Critério de Precisão (CP), para as bifidobactérias, com base no Guia OGC00XX (IPAC, 2015).

Amostra	X_{iA}	X_{iB}	$Y_{iA} = \text{Log}_{10}(X_{iA})$	$Y_{iB} = \text{Log}_{10}(X_{iB})$	R Log	n	$\bar{R} = \frac{\sum R \text{Log}}{n}$	CP	Aceitação (*)
G1 / Duplicado	$5,30 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$	6,724	6,716	0,008	15	0,076	0,247	Aceita
G2 / Duplicado	$3,90 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6$	6,591	6,544	0,047				Aceita
G3 / Duplicado	$5,60 \times 10^6$	$4,40 \times 10^6$	6,748	6,643	0,105				Aceita
G4 / Duplicado	$5,80 \times 10^6$	$4,50 \times 10^6$	6,763	6,653	0,110				Aceita
H1 / Duplicado	$2,40 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$	7,380	7,255	0,125				Aceita
H2 / Duplicado	$1,80 \times 10^7$	$1,90 \times 10^7$	7,255	7,279	0,023				Aceita
H3 / Duplicado	$1,70 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	7,230	7,176	0,054				Aceita
H4 / Duplicado	$1,90 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	7,279	7,301	0,022				Aceita
I2 / Duplicado	$5,50 \times 10^6$	$6,30 \times 10^6$	6,740	6,799	0,059				Aceita
I3 / Duplicado	$5,40 \times 10^6$	$4,30 \times 10^6$	6,732	6,633	0,099				Aceita
I4 / Duplicado	$6,10 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$	6,785	6,716	0,069				Aceita
J1 / Duplicado	$4,10 \times 10^6$	$5,70 \times 10^6$	6,613	6,756	0,143				Aceita
J2 / Duplicado	$5,20 \times 10^6$	$3,80 \times 10^6$	6,716	6,580	0,136				Aceita
J3 / Duplicado	$4,00 \times 10^6$	$4,40 \times 10^6$	6,602	6,643	0,041				Aceita
J4 / Duplicado	$5,30 \times 10^6$	$4,30 \times 10^6$	6,724	6,633	0,091				Aceita

(*) Aceitável se a amplitude (R Log) for inferior ao Critério de Precisão (CP).

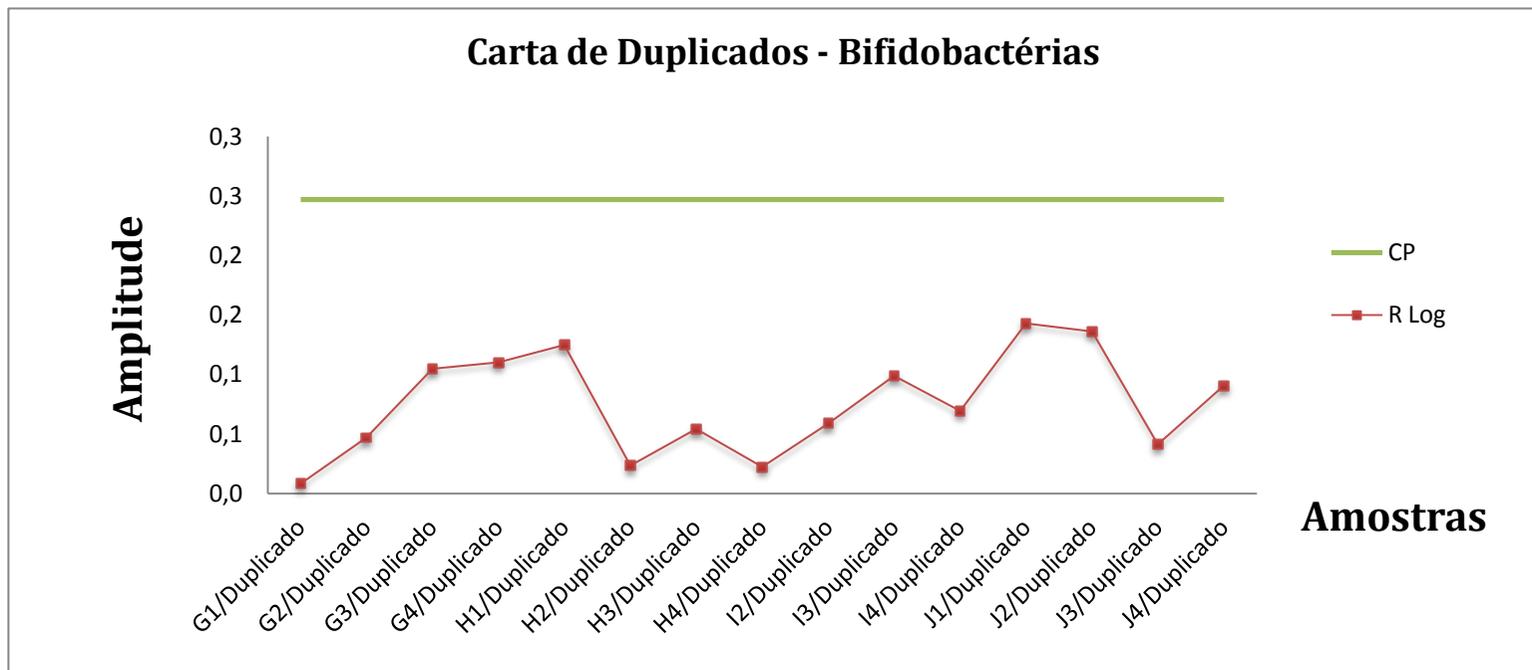


Figura 5.7: Carta de Duplicados correspondente às contagens de bifidobactérias, em 15 amostras de iogurtes, sendo CP o critério de precisão e R Log a amplitude dos logaritmos dos duplicados.

5.6. Cálculo da Estimativa da Incerteza

5.6.1. Flora Específica

Tabela 5.5: Cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade (S_R), do limite de reprodutibilidade (R) e da Incerteza Expandida (U), expressos em Log_{10} (UFC/g), para a flora específica do iogurte, com base no Guia OGC005 (IPAC, 2006).

Amostra	X_{iA}	X_{iB}	$Y_{iA} = \text{Log}_{10}(X_{iA})$	$Y_{iB} = \text{Log}_{10}(X_{iB})$	R log	$S_{Ri}^2 = \frac{(Y_{iA} - Y_{iB})^2}{2}$	n	$\sum S_{Ri}^2$	S_R	R	U
A1 / Paralelo	$7,30 \times 10^8$	$6,70 \times 10^8$	8,863	8,826	0,037	0,001	20	0,048	0,049	0,137	± 0,098
A2 / Paralelo	$9,50 \times 10^8$	$1,00 \times 10^9$	8,978	9,000	0,022	0,000					
A3 / Paralelo	$6,40 \times 10^8$	$6,90 \times 10^8$	8,806	8,839	0,033	0,001					
A4 / Paralelo	$5,10 \times 10^8$	$4,60 \times 10^8$	8,708	8,663	0,045	0,001					
B1 / Paralelo	$9,00 \times 10^8$	$7,40 \times 10^8$	8,954	8,869	0,085	0,004					
B2 / Paralelo	$7,80 \times 10^8$	$6,70 \times 10^8$	8,892	8,826	0,066	0,002					
B3 / Paralelo	$5,20 \times 10^8$	$5,90 \times 10^8$	8,716	8,771	0,055	0,002					
B4 / Paralelo	$7,20 \times 10^8$	$8,10 \times 10^8$	8,857	8,908	0,051	0,001					
C1 / Paralelo	$4,10 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	8,613	8,447	0,166	0,014					
C2 / Paralelo	$3,70 \times 10^8$	$3,60 \times 10^8$	8,568	8,556	0,012	0,000					
C3 / Paralelo	$4,90 \times 10^8$	$3,60 \times 10^8$	8,690	8,556	0,134	0,009					
C4 / Paralelo	$3,10 \times 10^8$	$2,90 \times 10^8$	8,491	8,462	0,029	0,000					
D1 / Paralelo	$3,10 \times 10^8$	$2,50 \times 10^8$	8,491	8,398	0,093	0,004					
D2 / Paralelo	$4,80 \times 10^8$	$5,80 \times 10^8$	8,681	8,763	0,082	0,003					
D3 / Paralelo	$3,10 \times 10^8$	$3,20 \times 10^8$	8,491	8,505	0,014	0,000					
D4 / Paralelo	$2,70 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	8,431	8,447	0,016	0,000					
E1 / Paralelo	$2,60 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	8,415	8,447	0,032	0,001					
E2 / Paralelo	$2,60 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$	8,415	8,342	0,073	0,003					
E3 / Paralelo	$2,00 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	8,301	8,362	0,061	0,002					
E4 / Paralelo	$2,80 \times 10^8$	$3,00 \times 10^8$	8,447	8,477	0,030	0,000					

5.6.2. Bifidobactérias

Tabela 5.6: Cálculo do desvio padrão de reprodutibilidade (S_R), do limite de reprodutibilidade (R) e da Incerteza Expandida (U), expressos em Log_{10} (UFC/g), para as bifidobactérias, com base no Guia OGC005 (IPAC, 2006).

Amostra	X_{iA}	X_{iB}	$Y_{iA} = \text{Log}_{10}(X_{iA})$	$Y_{iB} = \text{Log}_{10}(X_{iB})$	R log	$S_{Ri}^2 = \frac{(Y_{iA} - Y_{iB})^2}{2}$	n	$\sum S_{Ri}^2$	S_R	R	U
G1 / Paralelo	$5,20 \times 10^6$	$5,00 \times 10^6$	6,716	6,699	0,017	0,000	15	0,045	0,055	0,154	$\pm 0,110$
G2 / Paralelo	$3,70 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	6,568	6,602	0,034	0,001					
G3 / Paralelo	$5,10 \times 10^6$	$3,40 \times 10^6$	6,708	6,531	0,176	0,016					
G4 / Paralelo	$5,20 \times 10^6$	$4,50 \times 10^6$	6,716	6,653	0,063	0,002					
H1 / Paralelo	$2,10 \times 10^7$	$2,40 \times 10^7$	7,322	7,380	0,058	0,002					
H2 / Paralelo	$1,90 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$	7,279	7,255	0,023	0,000					
H3 / Paralelo	$1,60 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$	7,204	7,255	0,051	0,001					
H4 / Paralelo	$1,90 \times 10^7$	$1,70 \times 10^7$	7,279	7,230	0,048	0,001					
I2 / Paralelo	$6,00 \times 10^6$	$5,40 \times 10^6$	6,778	6,732	0,046	0,001					
I3 / Paralelo	$4,90 \times 10^6$	$4,50 \times 10^6$	6,690	6,653	0,037	0,001					
I4 / Paralelo	$5,60 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6$	6,748	6,778	0,030	0,000					
J1 / Paralelo	$4,90 \times 10^6$	$4,60 \times 10^6$	6,690	6,663	0,027	0,000					
J2 / Paralelo	$4,50 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	6,653	6,477	0,176	0,016					
J3 / Paralelo	$4,20 \times 10^6$	$4,60 \times 10^6$	6,623	6,663	0,040	0,001					
J4 / Paralelo	$4,80 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	6,681	6,602	0,079	0,003					

As Cartas de Duplicados são ferramentas importantes, uma vez que acompanham o desempenho técnico do analista no laboratório, ao longo do tempo, de modo a verificar a estabilidade das suas medições e as causas especiais de variação do processo experimental (pontos fora do limite de controlo – Critério de Precisão)

Através da análise das Cartas de Duplicados para as contagens da flora específica do iogurte (figuras 5.6) e de bifidobactérias (figura 5.7), observou-se que todos os resultados encontram-se abaixo do limite superior de controlo (Critério de Precisão), não havendo qualquer rejeição dos mesmos. Isto leva a concluir que o factor técnico não interferiu nas medições, uma vez que os resultados obtidos são semelhantes entre si.

Nos estudos de reprodutibilidade foram avaliados os limites de reprodutibilidade (R) com base nos valores de amostras realizadas em paralelo. Os valores dos limites de reprodutibilidade obtidos foram de 0,137 Log (UFC/g) para as contagens da flora específica do iogurte (tabela 5.5) e de 0,154 Log (UFC/g) para as bifidobactérias (tabela 5.6). Isto significa que a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de reprodutibilidade, não deve exceder os valores de 0,137 Log (UFC/g), para a flora específica do iogurte e de 0,154 Log (UFC/g) para as bifidobactérias.

O limite de reprodutibilidade capacita o analista de decidir se a diferença entre análises de uma mesma amostra, determinada sob condições de reprodutibilidade (ensaio em paralelo) é, ou não, significativa.

Através da análise dos resultados das contagens da flora específica do iogurte (tabela 5.5) e das bifidobactérias (tabela 5.6), é possível verificar que as diferenças absolutas entre dois ensaios são inferiores aos respectivos limites de reprodutibilidade calculados, excepto para os valores marcados a rosa.

Desta forma, apesar de existirem 3 valores (1 para a flora específica do iogurte e 2 para as bifidobactérias) cujos valores das diferenças absolutas entre os dois ensaios são superiores aos respectivos limites de reprodutibilidade, conclui-se que a diferença entre análises em paralelo de uma amostra, sob condições de reprodutibilidade, não é significativa.

Relativamente ao cálculo da Incerteza Expandida (U), os valores obtidos foram de $\pm 0,098$ Log₁₀, para as contagens da flora específica do iogurte (tabela 5.5), e de $\pm 0,110$ Log₁₀, para as contagens de bifidobactérias (tabela 5.6).

Isto significa que, sendo o valor médio das contagens totais da flora específica do iogurte de $4,8 \times 10^8$ UFC/g, para as 20 amostras de iogurtes, existe uma probabilidade de 95% de encontrar todos os valores no intervalo entre $3,8 \times 10^8$ e $6,0 \times 10^8$ UFC/g.

No caso das bifidobactérias, para um valor de médio de $9,0 \times 10^6$ UFC/g, para as amostras de iogurtes cujos valores são positivos (ou seja, para 15 amostras de iogurtes), existe uma probabilidade de 95% de encontrar todos os valores entre $7,0 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^7$ UFC/g.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O iogurte é um alimento que faz parte do dia-a-dia dos portugueses, não só por ser um alimento com boas propriedades organolépticas e nutricionais, mas cujo consumo regular apresenta inúmeras vantagens para a saúde humana. Constata-se também que o iogurte está em plena expansão em Portugal e no Mundo, e com uma perspectiva de crescimento contínuo. Com a elaboração da presente dissertação de mestrado foi possível chegar às seguintes conclusões:

Em primeiro lugar, as contagens da flora específica do iogurte, através do método da ISO 7889:2003, apresentam um valor médio de $4,8 \times 10^8$ (mínimo: $2,5 \times 10^8$; máximo: $7,2 \times 10^8$) UFC/g de produto, existindo uma probabilidade de 95% de encontrar todos os valores entre $3,8 \times 10^8$ e $6,0 \times 10^8$ UFC/g. Estes valores vão ao encontro dos valores estabelecidos pela legislação portuguesa em vigor. Contudo, apesar de não se ter verificado crescimento de *L. bulgaricus* na maioria das amostras de iogurtes, não se revelou um problema uma vez que a legislação portuguesa não apresenta valores da enumeração para estes microrganismos em separado.

O método da norma portuguesa NP 1864, actualmente utilizado pela empresa SGS Portugal, S.A. para a enumeração da flora específica do iogurte, é idêntico à metodologia descrita pela norma ISO 7889:2003. Desta forma, não foi necessário realizar a técnica em paralelo com a metodologia a ser implementada, facilitando, assim, a implementação e validação da norma ISO 7889:2003 na empresa.

As contagens de bifidobactérias, através do método da ISO 29981:2010, apresentam valores entre os 0 e os $2,8 \times 10^7$ UFC/g de produto. Porém, das 20 amostras de iogurtes probióticos analisadas, apenas 15 apresentam resultados positivos, alcançado um valor médio de $9,0 \times 10^6$ (mínimo: $3,8 \times 10^6$; máximo: $2,8 \times 10^7$) UFC/g, existindo uma probabilidade de 95% de encontrar todos os valores entre $7,0 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^7$ UFC/g. Estas 15 amostras são terapeuticamente eficazes, em todo o prazo de validade do produto, uma vez que apresentam valores de contagens de bactérias probióticas superiores a 10^6 UFC/g, sendo este o valor mínimo necessário para que um iogurte seja considerado como probiótico.

Com base nos resultados obtidos e no cumprimento dos requisitos preconizados nos procedimentos de validação de métodos microbiológicos, foi possível a validação destas metodologias e as suas implementações na empresa SGS Portugal, S.A.

A importância da validação rege-se no facto desta ser fundamental para definir se os métodos desenvolvidos são apropriados aos objectivos a que se destinam, a fim de obter dados confiáveis e adequados à qualidade pretendida.

Em suma, as metodologias que permitem a contagem da flora específica do iogurte e de bifidobactérias, em iogurtes, passaram a fazer parte dos recursos e serviços do laboratório de microbiologia da empresa SGS Portugal, S.A.

Contudo, após a implementação e validação das metodologias ISO 7889:2003 e 29981:2010, são sugeridas algumas propostas que podem ser realizadas futuramente:

- Quando não existe crescimento de *S. thermophilus*, ou este é muito lento, é sugerido o aumento da temperatura de incubação (39 a 42 °C durante 48 horas ou 45 °C durante 24 horas) (ISO 7889, 2003);
- Quando não existe crescimento de *L. bulgaricus*, ou este é muito lento, é sugerido o aumento do tempo de incubação (5 ou 6 dias, a 37 °C, em condições de anaerobiose), ou da temperatura de incubação (40 a 42 °C durante 72 horas ou 45 °C durante 48 horas, ambas em condições de anaerobiose) (ISO 7889, 2003);
- Quando os *L. bulgaricus* crescem em condições de anaerobiose no iogurte, não podem ser enumerados no meio MRS Agar. Quando este problema ocorre, é sugerido a substituição do meio MRS Agar pelo meio LBA (Laked Blood Agar), desenvolvido pela NIZO Food Research, e posterior incubação a 50 °C ± 0,5 °C durante 72 horas (ISO 7889, 2003);
- Realização de ensaios para avaliar o comportamento da flora específica do iogurte e de bifidobactérias face a alguns factores (como o pH baixo, o tempo e a temperatura de armazenamento, entre outros) que possam comprometer a resistência e a viabilidade dos microrganismos em estudo;
- Realização de um ensaio de comparação interlaboratorial dos temas em estudo, de modo a avaliar a respectiva competência técnica e para monitorizar a integridade dos resultados dos ensaios.

7. BIBLIOGRAFIA

Akalin, A.S., Fenderya, S., Akbulut, N. (2004). *Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage*. International Journal of Food Science and Technology, 39: 613-621

Allgeyer, L.C., Miller, M.J., Lee, S.Y. (2010). *Drivers of liking for yogurt drinks with prebiotics and probiotics*. Journal of Food Science, 75(4): S212–219

APN (2015): Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Disponível em <http://www.apn.org.pt>, acessado a 4 de Abril de 2015

Arunachalam, K. D. (1999) *Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and tecnologia*. Nutrition Research, 19: 1559-1597

Aryana, K. J., McGrew, P. (2007). *Quality attributes of yogurt with Lactobacillus casei and various prebióticos*. LWT-F Science Technology, 40(10): 1808-14

Ashraf, R., Shah, N. P. (2011). *Selective and differential enumerations of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei and Bifidobacterium spp. in yoghurt--a review*. International Journal of Food Microbiology, 149: 194-208

Beerens, H., Gavini, F., Neut, C. (2000). *Effect of exposure to air on 84 strains of bifidobacteria*. Anaerobe, 6: 65-67

Biavati, B., Vescovo M., Torriani, S., Bottazzi, V. (2000). *Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications*. Annals of Microbiology, 50: 117-131

BRASIL (2000), *Resolução nº5 de 13 de novembro de 2000: Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,.. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília. Disponível em http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/leite_piq_leite_fermentado.htm, acessado a 28 de Março de 2015

Breed, S., Murray, E., Smith, N.R. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, p. 465, 708-709

Cano-Sancho, G., Perelló, G., Nadal, M., Domingo, J. L. (2015). *Comparison of the nutritional composition and the concentrations of various contaminants in branded and private label yogurt*. Journal of Food Composition and Analysis, 42: 71-77

Chandan, R. C., White, C. H., Kilara, A., Hui, Y.H. (2006). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. 1st edition, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, p. 73-87

CODEX Alimentarius Commission (2003). *CODEX standard for fermented milks 243-2003*. Disponível em www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf, acessado a 16 de Março de 2015

Danone (2015). Disponível em <http://www.danone.com>, acessado a 6 de Abril de 2015

Dave, R. I., Shah, N. P. (1997). *Viability of yogurt and probiotic, in yogurt made from commercial starter cultures*. International Dairy Journal, 7(1): 31-41

Deeth, H.C., Tamime, A. Y. (1981). *Yogurt: nutritive and therapeutic aspects*. Journal Food Protection, 44: 78-96

Donkor, O. N., Henriksoon, A., Vasilj-Evic, T., Shah, N. P. (2006). *Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage*. Internaciona Dairy Journal, 16: 1181-1189

Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V., Akbarian-Moghari, A. (2011). *Effect of probiotic yogurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus*. Journal of Dairy Science, 94: 3288-3294

FAO/WHO (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Córdoba, Argentina

Farnworth, E. R. (2008). *Handbook of fermented functional foods*. CRC Press, Boca Raton, p. 130-131

Fuller, R. (1989). *Probiotics in man and animals*. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365–378

Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., Biavati, B. (2011). *The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact on food safety*. Trends in Food Science and Technology, 22: S58–S66

Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics*. Trends in Food Science & Technology, 10: 139-157

Gregerson, T. (1978). *Rapid Method for Dstinction of Gram-Negative from Gram-Positive Bacteria*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 5: 123-127

Guia Relacre nº 6 (2007). *Acreditação de Laboratórios de Ensaaios Microbiológicos*, Relacre, IPQ, Portugal

Guia Relacre nº 13 (2000). *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Relacre, IPQ, Portugal

Halebian, S., Harris, B., Finegold, S. M., Rolfe, A. D. (1981). *Rapid Method That Aids in Distinguishing Gram-Positive from Gram-Negative Anaerobic Bacteria*. Journal of Clinical Microbiology, 13(3): 444-448

Hamann, W. T., Marth, E. H. (1983). *Survival of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus in commercial and experimental yogurts*. Journal of Food Protection, 47(10): 781–786

Harvey, R. A., Champe, P. C., Fisher, B. D. (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*, 2nd edition, Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia, p. 25

Hasler, C. M. (2002). *Functional Foods: Benefits Concerns and Challenges – A Position Paper from the American Council on Science and Health*. The Journal of Nutrition, 132: 3772-3781

Hekmat, S., Reid, G. (2006). *Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt*. Nutrition Research, 26(4): 163–166

Henry, J. (1996). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 19th Edition. Saunders, Philadelphia, p. 1556

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Baltimore (MD): Williams & Wilkins, p.787

Holzapel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth, Schillinger U. (2001). *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 365–373

Horiuchi, H., Sasaki, Y. (2012). *Short Communication: Effect Of Oxygen On Symbiosis Between Lactobacillus Bulgaricus And Streptococcus Thermophilus*. Journal Of Dairy Science, 95(6): 2904-2909

ILSI (2015): International Life Sciences Institute. Disponível em <http://www.ilsi.org>, acessado a 28 de Março de 2015

INE (2015): Instituto Nacional de Estatística. Disponível em <http://www.ine.pt>, acessado a 3 de Abril de 2015

INSA (2015): Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Tabela da Composição de Alimentos. Disponível em www.insa.pt, acessado em 26 de Março de 2015

IPAC, Instituto Português de Acreditação (2006). *Guia OGC05: Guia para a estimativa da Incerteza em Ensaios Microbiológicos*, Lisboa. Disponível em <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC005.pdf>, acessado a 1 de Fevereiro de 2015

IPAC, Instituto Português de Acreditação (2010). *Guia OGC001: Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*, Lisboa. Disponível em <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC001.pdf>, acessado a 28 de Janeiro de 2015

IPAC, Instituto Português de Acreditação (2015). *Guia OGC00XX: Guia para controlo de qualidade em laboratórios de microbiologia*, Lisboa

ISO 16140 (2003): *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods*. International Standard Organization, Geneva, Switzerland

ISO 17025 (2005): Requisitos gerais de competência para laboratório de ensaio e calibração. IPQ, Lisboa

ISO 19036 (2006): *Microbiology of food and animal feeding stuffs – guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. International Standard Organization, Geneva, Switzerland

ISO 29981 (2010): *Milk products -- Enumeration of presumptive bifidobacteria -- Colony count technique at 37 °C*. International Standard Organization, Geneva, Switzerland

ISO 5725-6 (1994): *Accuracy of measurement methods and results – Use in practice of accuracy value*, International Standard Organization, Geneva, Switzerland

ISO 7889 (2002): *Yogurt - Enumeration of characteristic microorganisms - Colony count technique at 37 °C*. International Standard Organization, Geneva, Switzerland

ISO, International Standard Organization (2015). Disponível em www.iso.org, acessado a 10 de Fevereiro de 2015

Kailasapathy, K., Rybka, S. (1997). *L. acidophilus and Bifidobacterium ssp.: their therapeutic potential and survival in yogurt*. The Australian Journal of Dairy Technology, 52 (1): 28-35

Kamila G., (2012). *Different Methods of Probiotics Stabilization*, InTech, DOI: 10.5772/50313. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/probiotics/different-methods-of-probiotics-stabilization>, acessado a 16 de Março de 2015

Kardel, G., Antunes, L. A. F. (1997). *Culturas lácticas e probióticas empregadas na fabricação de leites fermentados: leites fermentados*. Em: Lerayer, A. L. S., Salva, T. J. G. Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado. Campinas: ITAL, 2: 26-33

Kneifel, W., Ulberth, F., Erhard, F., Jaros, D. (1992). *Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products*, Milchwissenschaft, 47: 362-365

Kristo, E., Biliaderis, C. G., Tzanetakis, N. (2003). *Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology*. Food Chemistry, 83(3): 437–446

Kurmann, J. A., Rasic, J. L. (1991). *The health potential of products containing bifidobacteria*. Em *Therapeutic properties of fermented milks* (R. K. Robinson edition), Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, p. 117–157

Lidon, F., Silvestre, M. (2008). *Conservação de Alimentos. Princípios e Metodologias*. 1ª Edição. Escolar Editora. Lisboa, p. 200 –218

Lidon, F., Silvestre, M. (2010) *Princípios da Alimentação e Nutrição Humana*, Escolar Editora, Lisboa, p.532-535

Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. (2001) *Yoghurt as probiotic carrier food*. International Dairy Journal, 11: 1–17

Marteau, P., de Vrese, M., Cellier, C. J. Schrezenmeir, J. (2001), *Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics*. The American Journal of Clinical Nutrition, 73: 430–436

Martins, F., Pinho, O., Ferreira I. M. P. L. O. (2004). *Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação*. Alimentação Humana, 10: 67-78

Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. (2002). *Technological challenges for future probiotic foods*. International Dairy Journal, 12: 173-182

Mazahreh, A., Ershidat, O. (2009). *The Benefits of Lactic Acid Bacteria in Yogurt on the Gastrointestinal Function and Health*. Pakistan Journal of Nutrition, 8: 1404-1410

Mazo, J. Z., Ilha, E. C., Arisi, A. C. M., Sant'anna, E. S. (2009). *bifidobactérias: Isolamento, identificação e aplicação em alimentos probióticos*. B.CEPPA, 27(1): 119-134

Metchnikoff, E. (1907). *The prolongation of life: optimistic studies*. New York & London: G.P. Putnam's Sons, p.161-183

Muramalla, T., Aryana, K. J. (2011). *Some low homogenization pressures improve certain probiotic characteristics of yogurt culture bacteria and Lactobacillus acidophilus La-K*. Journal of Dairy Science, 94: 3725-3738

Ouwehand, A.C., Salvadori, B., Fondén, R., Mogensen, G., Salminen, S., Sellars, R. (2003). *Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans*. Bulletin of the International Dairy Federation, 380: 4-19

Pette J.W., Lolkema H. (1950). *Yogurt, III: acid production and aroma formation in yogurt*. Milk Dairy Journal, 4: 261–73

Portaria nº. 742/92, de 24 de Julho (1992), *Estabelece Regras de produção, Comercialização e Consumo de Iogurtes e de Leites Fermentados*. Diário da República nº. 169 – I Série. Ministérios da Agricultura e do Comércio e Turismo, Lisboa

Puhan, Z., Flueller, O., Banhegyi, M. (1973). *Composition of lactic acid bacterial flora and lactic acid configuration in commercial Swiss yogurt*. Proceedings of the XIX International Dairy Congress, p. 451

Radke-Mitchell L. C., Sandine W. E. (1986) *Influence of temperature on associated growth of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus*. Journal Dairy Science, 69: 2558-2568

Radke-Mitchell, L. C., Sandine, W. E. (1984) *Associative growth and differential enumeration of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus: a review*. Journal of Food Protection, 47: 245-248

Robinson, R. K. (2002). *Dairy microbiology handbook: The Microbiology of Milk and Milk Product*. 3rd edition. New York: Wiley, p.367-430

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. Journal of Biotechnology, 84: 197-215

Saboya, L. V., Oetterer, M., Oliveira, A. J. (1997) *Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados: uma revisão*. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 31(2): 176-185

Saccaro, D. M., Hirota, C. Y., Tamime, A. Y., de Oliveira, M. N. (2012). *Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk*. African Journal of Microbiology Research, 5: 3901-3906

Salado, G. A., Andrade, M. O. (1989). *Processamento e qualidade nutricional do iogurte*. Boletim Cultural, 7: 1-35

Salminen S., Deighton M. A., Benno Y., Gorbach S. L. (1998). *Lactic Acid Bacteria – Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker, New York, p. 211–255

Samona, A., Robinson, R. K. (1994) *Effect of yogurt cultures on the survival of Bifidobacteria in fermented milks*. Journal of Society of Dairy Technology, 47(2): 58-60

Shieh, M. J., Shang, H. F., Liao, F. H., Zhu, J. S., Chien, Y. W. (2011) *Lactobacillus fermentum* improved intestinal bacteria flora by reducing *Clostridium perfringens*. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 6: 59-63

Silva, A. R., Moro, L. M., Pinto, E. G., Souza, A. F., Franco, B. (2012) *Estudo do comportamento cinético e reológico da fermentação láctica na produção de iogurte natural*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. Goiânia, 8(14): 1907-1913

SGS (2015). Disponível em <http://www.sgs.pt>, acessado a 5 de Janeiro de 2015

Souza, G. (1991). *Fatores de Qualidade do Iogurte*. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brazil, 21: 20–27

Souza, P. H. M.; Souza, M. H.; Maia, G. A. (2003). *Componentes funcionais nos alimentos*. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 37(2): 127-135

Suzuki, I., Kato, S., Kitada, T., Yano, N., Morichi, T. (1986). *Growth of Lactobacillus bulgaricus in milk. I. Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk*. Journal Dairy Science, 69: 311-320

Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. (2007). *Selective enumeration and identification of mixed cultures of Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei and Bifidobacterium lactis in fermented milk*. International Dairy Journal, 17: 1107-1114

Tamime A. Y., Robinson R. K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt: Science and Technology*. 3rd edition. Woodhead Publishing Ltd. LLC, NW, U.S.A., p.468-534

Tamime, A. Y. (2006). *Fermented Milks*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, p.1 – 12

Tharmaraj, N., Shah, N. P. (2003). *Selective enumeration of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus and propionibacteria*. Journal of Dairy Science, 86: 2288-2296

Tomaselli, L. P. C., Pedroso, P. Z., Foppa, T., Oliveira, L. P. (2011). *Viabilidade e sobrevivência da bactéria Bifidobacterium em fluido gástrico simulado*. Evidência, Joaçaba, 11(2): 7-14

Turroni, F., Sinderen, D., Ventura, M. (2011). *Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium*. International Journal of Food Microbiology, 149: 37-44

Verschuren, P. M. (2002). *Functional foods: scientific and global perspectives*. British Journal of Nutrition, 88: 125-130

Ward, P., Roy, D. (2005). *Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria*. Lait, 85: 23-32

Williams, N. T. (2010). *Probiotics – Clinical Review*. American Journal of Health-System Pharmacists, 67: 449-458